

Der Einfluß von Calpain auf die Reperfusionsphase nach koronarer Ischämie am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
aus

Markus Wolfgang Attenberger
Bad Hersfeld

Giessen 2003

Aus dem Medizinischem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

des Universitätsklinikums Giessen

und

aus dem Institut für Biochemie
Leiter: Prof. Dr. A. M. Pingoud

der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Dr. W. Wende

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Schaper

Tag der Disputation: 23.07.2003

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Myokardischämie-Reperfusionssyndrom	1
1.2 Calpain-Calpastatin-System	5
1.2.1 Struktureller Aufbau von Calpainen	5
1.2.2 Aktivierung von Calpainen und dessen Nachweis.....	8
1.2.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Calpainen	10
1.2.4 Calpain-Inhibitoren und deren protektive Effekte	11
 2 Fragestellung	 14
 3 Material und Methoden.....	 15
3.1 Versuchstiere	15
3.2 Organentnahme	15
3.3 Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzens	18
3.3.1 Perfusionslösung	20
3.4 Versuchsmonitoring	21
3.4.1 Kontinuierliches Monitoring	21
3.4.2 Diskontinuierliches Monitoring	22
3.4.3 Bestimmung der CK	22
3.4.4 Bestimmung der LDH.....	23
3.5 Verwendete Substanzen.....	25
3.5.1 Lipopolysaccharide.....	25
3.5.2 Calpain-Inhibitor.....	24
3.6 Versuchsdurchführung	24
3.7 Statistische Methoden.....	26
 4 Zwischenergebnis.....	 27
4.1 Auswertung der Ergebnisse des kontinuierlichen Monitorings	27
4.1.1 Relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude	28
4.1.2 Koronarer Gesamtwiderstand	29
4.1.3 Herzfrequenz	30

4.2 Auswertung der Ergebnisse des diskontinuierlichen Monitorings	31
4.2.1 Kreatinphosphokinase (CK)	31
4.2.2 Lactat-Dehydrogenase (LDH)	32
5 Fragestellung	34
6 Material und Methoden	35
6.1 Fluoreszenzspektroskopie	35
6.2 Verwendete Substanzen und Geräte	37
6.2.1 Fluoreszenzspektrometer	37
6.2.2 Substrate und Fluorophor	37
6.2.3 Calpain-Inhibitor	39
6.2.4 Proteasom-Inhibitor	39
6.2.5 Proteinaseinhibitoren	40
6.2.6 Calpain und Calpain-Messpuffer	41
6.3 Versuchsdurchführung	42
6.3.1 Standarddeichkurven	42
6.3.2 In vitro Versuche	43
6.3.2.1 Gewinnung von Gewebehomogenat	44
6.3.2.2 Wirkung verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Herzmuskelhomogenat	45
6.3.2.3 Wirkung verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Spaltung von <i>SLY-AMC</i> durch Herzmuskelhomogenat	46
6.3.2.4 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Herzmuskel- und Lungenhomogenat	47
6.3.2.5 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Herzmuskelhomogenat	49
6.3.2.6 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Calpain I	51
6.3.3 In vivo Versuche	53
6.4 Statistische Methoden	55

7 Zwischenergebnis	56
7.1 Auswertung der Ergebnisse der in vitro Versuche	56
7.1.1 Wirkung verschiedener Proteaseninhibitoren auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Herzmuskelhomogenat	56
7.1.2 Wirkung verschiedener Proteaseninhibitoren auf die Spaltung von <i>SLY-AMC</i> durch Herzmuskelhomogenat	57
7.1.3 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Herzmuskel- und Lungenhomogenat	58
7.1.4 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Herzmuskelhomogenat	59
7.1.5 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von <i>SLLVY-AMC</i> durch Calpain I	60
7.2 Auswertung der Ergebnisse der in vivo Versuchsreihe	61
8 Diskussion	63
9 Zusammenfassung	67
10 Literaturverzeichnis	69
11 Anhang	73
11.1 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	73
Danksagung	74
Lebenslauf	75

1. Einleitung

1.1 Myokardischämie-Reperfusionssyndrom

Ischämien verschiedener Organsysteme verursachen heute einige der häufigsten und wichtigsten Erkrankungen der täglichen Praxis. Dazu zählen zum Beispiel Angina pectoris und Myokardinfarkt, zerebrovaskuläre Infarkte, embolische Gefässverschlüsse, arterielle Verschlusskrankheit und Organischämien im Rahmen der Transplantationsmedizin. Fortschritte der modernen Medizin machen es möglich, viele dieser Erkrankungen im Frühstadium durch chirurgische und pharmakologische Massnahmen zu verhindern. Ziel ist es dabei, durch diese präventiven Massnahmen Infarzierung bzw. Zellnekrose im ischämischen Gewebe abzumildern oder vollständig rückgängig zu machen. Die Ischämie definiert sich im Gegensatz zur Hypoxie als Sauerstoffmangel mit Perfusionsstörung, während bei der Hypoxie lediglich ein Sauerstoffmangel vorliegt. Durch die Perfusionsstörung kommt es bei der Ischämie zur Kumulation saurer Stoffwechselmetabolite mit konsekutiver Gewebsazidose, sowie zu verminderter Substratzufuhr. Das verminderte O₂-Angebot führt ausserdem zur Ausschöpfung der hämoglobin- und myoglobingebundenen Sauerstoffreserven. Mit dem Ausfall der aeroben ATP-Synthese erfolgt der Verbrauch der Kreatininphosphatspeicher, sowie die Umstellung auf die anaerobe Energiegewinnung. Dadurch kann der Bedarf an energiereichem ATP jedoch nur kurzfristig aufrechterhalten werden, was schliesslich zur irreversiblen Zellschädigung führt.

Am Herzen führen solche längerdauernden Ischämien zum Infarkt des ischämischen Gewebes, der je nach Lokalisation und Ausmass zu akuten Komplikationen wie Herzrhythmus- bzw. Reizleitungsstörungen, akuter Herzinsuffizienz, bis hin zum kardiogenen Schock führen kann. Desweiteren kommen im Verlauf eines Myokardinfarktes Thromboembolien, Herzwand- und Ventrikelseptumrupturen, Mitralinsuffizienzen infolge einer Papillarmuskelbeteiligung, sowie Perikarditiden und das Dressler-Syndrom (Postmyokardinfarkt-Syndrom) vor.

Pathogenetisch zählt die Ruptur eines intrakoronaren Plaque mit nachfolgendem Verschluss des betroffenen Herzkranzgefässes zu den häufigsten Ursachen von Ischämien beim Menschen.

In der klinischen Therapie des akuten Myokardinfarktes hat sich die frühzeitige koronare Revaskularisierung und Reperfusion zur Limitierung der Infarktgrösse als Mittel der Wahl erwiesen. Zu diesem Zweck stehen moderne Therapieverfahren, wie Thrombolyse, Laserangioplastie, intrakoronare Aspirations-thrombektomie sowie Ballondilatation durch PTCA (perkutane transluminale koronare Angioplastie) und Stentimplantation, zur Verfügung. Da die Ischämietoleranzzeit des Herzmuskelgewebes etwa 2 bis 4 Stunden beträgt, kann eine solche Wiederherstellung des Blutflusses in dieser Zeit einen Infarkt häufig vollständig verhindern. Nach dieser Zeitspanne kommt es zum sukzessiven und irreversiblen Untergang von Herzmuskelzellen. Dennoch belegen grosse klinische Studien, dass eine myokardiale Reperfusion noch nach dem Ablauf dieser Zeitspanne günstige Auswirkungen auf die Stabilität des Herzrhythmus und die geometrischen Umbauvorgänge des Herzmuskels („Remodeling“) hat. Jedoch hat sich in verschiedenen Studien an Tiermodellen gezeigt, dass die Reperfusion ischämischen Gewebes zu weiterer Zellschädigung beitragen kann. Dieser Reperfusionsschaden wird unter dem Oberbegriff Reperfusionssyndrom zusammengefasst und bezieht sich kausal auf eine Schädigung in der Reperusionsphase, die nicht in der vorausgehenden Ischämiephase aufgetreten ist. Die Unterscheidung zwischen den in der Ischämiephase entstandenen Schäden und denjenigen Schäden, die der Reperusionsphase zuschreibbar sind, ist schwierig. Es stellt sich die Frage, ob durch Ischämie geschädigtes, jedoch potentiell überlebensfähiges Gewebe, durch Reperfusion direkt zerstört wird, oder ob die Reperfusion die durch Ischämie in Gang gesetzten biochemischen Prozesse, die letztenendes zum Zelluntergang führen, lediglich beschleunigt.

Das Schaubild in Abbildung 1-1 soll den Zusammenhang zwischen Ischämieschaden und Zellschädigung in der Reperusionsphase verdeutlichen. Während der Ischämiephase ist ein grosser Teil des Gewebes biochemischen und pathologischen Prozessen unterworfen, die jedoch reversibel sind. Diese Zellen bleiben potentiell überlebensfähig. Ein kleinerer Teil wird jedoch vor Einsetzen der Reperfusion irreversibel geschädigt und wird nekrotisch. Zum Beginn der Reperfusion und der damit verbundenen Reoxygenierung können sich die potentiell lebensfähigen Zellen entweder vollständig erholen, oder sie werden ebenfalls nekrotisch. Diese potentiell lebensfähigen Zellen bilden zum Zeitpunkt

der einsetzenden Reperfusionphase das von S.R.J. Maxwell beschriebene „Schlachtfeld“ der Reperfusion. Nach der Reperfusion lassen sich nekrotische Zellen jedoch nicht mehr danach unterscheiden, ob sie schon in der Ischämiephase irreversibel geschädigt wurden, oder ob sie erst in der Reperfusionphase abgestorben sind.

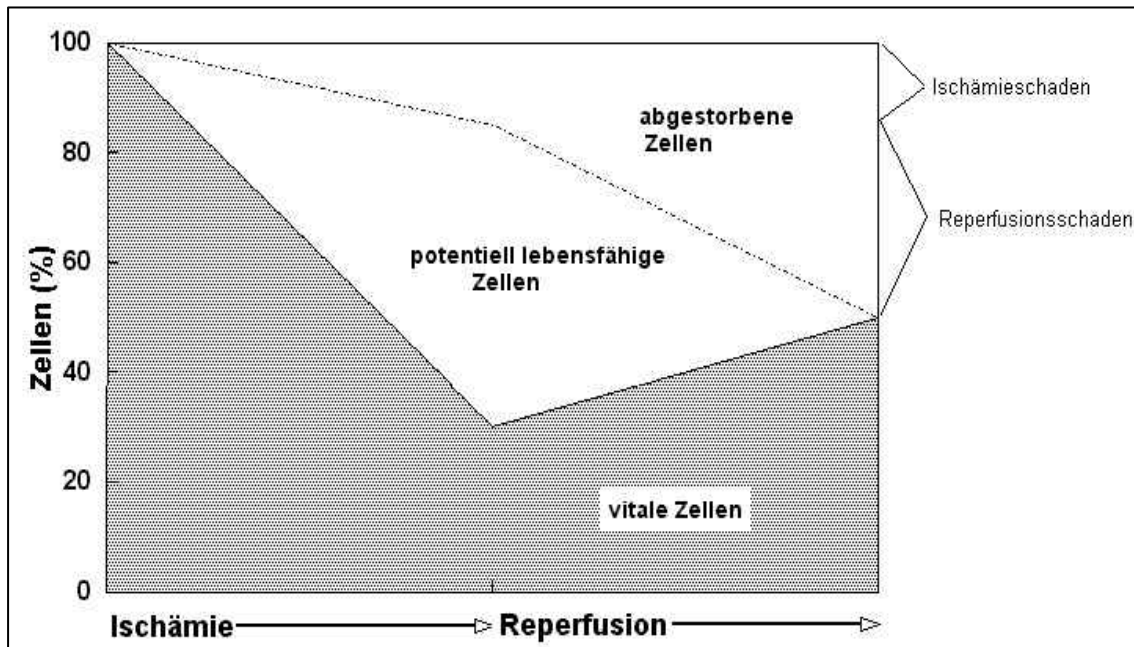


Abb. 1-1 Reperfusionsschaden nach S.R.J. Maxwell

Die Relevanz eines Reperfusionsschadens könnte man am besten durch die Gabe von Pharmaka während einer Ischämie-/Reperusionsphase demonstrieren, die potentiell lebensfähige Zellen rettet und damit sowohl die Gewebnekrose als auch eine Funktionseinschränkung des betroffenen Organs vermindert. Klinische Komplikationen, insbesondere Reperusionsarrhythmien oder ausgedehnte Hypokinesien im Infarktareal im Sinne eines „myocardial stunning“, infolge Revaskularisierungsmassnahmen, wie der Ballondilatation oder der Lysetherapie, könnten so in ihrer Inzidenz signifikant vermindert werden.

Das Reperfusionssyndrom wird nach heutiger Meinung durch eine Vielzahl pathophysiologischer und biochemischer Faktoren verursacht oder zumindest begünstigt. Reperfusion führt zu vaskulären und mikrovaskulären Schäden, die eine Wiederherstellung normaler koronarer Perfusionsverhältnisse behindern. Dies kann sich durch Steigerung des koronaren Gefässwiderstandes bis hin zum totalen Sistieren der koronaren Reperfusion, dem sogenannten

„no-reflow“-Phänomen, bemerkbar machen. Dieses „no-reflow“-Phänomen wurde in einer Vielzahl tierexperimenteller Studien beobachtet. Demnach kommt es in der Initialphase der Reperfusion zu einer überschüssigen reaktiven Hyperämie. Im Anschluss daran sistiert der koronare Fluss oder fällt auf Werte weit unterhalb des ursprünglichen, präischämischen Flusses ab. Als Ursachen des „no-reflow“-Phänomens werden in Verbindung mit den vaskulären Schäden, eine endotheliale Zellanschwellung, eine verminderte NO-Freisetzung und Kapillarverschlüsse durch Thrombozyten, neutrophile Granulozyten und Zelldetritus diskutiert. Dieser pathophysiologische Mechanismus wirkt sich im Verlauf einer Reperfusion schädlich auf die potentiell überlebensfähigen Zellen im ischämischen Gewebe aus, was zu einer beschleunigten Zellnekrose führt. Desweiteren spielt eine Gewebeschädigung durch Granulozytenaktivierung und vermehrte Zytokinausschüttung eine wichtige Rolle¹.

Diese Einflüsse erlauben zusammengefasst einen Rückschluss auf zwei wesentliche, histopathologische und sich gegenseitig verstärkende Schädigungsmechanismen:

Einerseits wird die, in verschiedenen Studien nachgewiesene, Entstehung freier Radikale, die zwar auch in der Ischämie- aber auch wesentlich in der Reperfusionsphase über verschiedenste Mechanismen stattfindet, für die direkte Schädigung von Kardiomyozyten verantwortlich gemacht. Die Entstehung solcher freier Radikale korreliert nachweislich umgekehrt proportional mit der funktionellen Erholung von geschädigtem Myokard und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Entstehung der kontraktilen Dysfunktion im Rahmen des „myocardial stunning“.

Ein weiterer Schädigungsmechanismus wird der Überladung des Zytosols der Kardiomyozyten mit Calcium während der Ischämie- und Reperfusionsphase zugeschrieben. Eine daraus resultierende Aktivierung energieverbrauchender, transmembranöser Calciumionentransporter führt zu einem erhöhten intrazellulären ATP-Verbrauch, der ebenfalls zu einer kontraktilen Dysfunktion mit regionalen Myokardhypokinesien und damit verbundener verminderter Pumpleistung beitragen könnte.

Diesen beiden Mechanismen wird ausserdem eine sich gegenseitig verstärkende Rolle zugeschrieben: Freie Radikale können beispielsweise die

Calciumüberladung durch Interaktion mit dem sarkoplasmatischem Retikulum beziehungsweise der Zellmembran, Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung oder der irreversiblen Hemmung der anaeroben Glykolyse, fördern².

Die Calciumüberladung kann neben diesen, in der Literatur häufig diskutierten, Ursachen des Reperfusionssyndromes ausserdem zur übermässigen Aktivitätssteigerung calciumabhängiger Proteasen, wie zum Beispiel dem Calpain, beitragen³.

(Quellen: H.M. Piper et al. (Review), S.R.J. Maxwell et al. (Review), bzw. ^{4; 5})

1.2 Calpain-Calpastatin-System

Calpaine und deren spezifischer endogener Inhibitor Calpastatin bilden ein Ca^{2+} -abhängiges proteolytisches System, dass bei Tier und Mensch weit verbreitet ist und offensichtlich in einer Vielzahl Ca^{2+} -vermittelter zellulärer Vorgänge eine Rolle spielt.

1964 wurde erstmals von Guroff et al. von der Existenz einer Ca^{2+} -abhängigen Protease im Rattenhirn berichtet. Diese von Guroff et al. beschriebene Proteinase wurden 1968 als Calpain bezeichnet⁶. Daraufhin folgte die Entdeckung verschiedener Calpaine und deren Untereinheiten sowie die Bestimmung der primären Struktur durch cDNA Klonierung. 1991 wurde dieser Enzymgruppe durch die „International Conference on Intracellular Protein Catabolism“ der Name Calpaine gegeben.

Das Interesse an diesen neutralen, heterodimeren, rasch-autolysierenden Enzymen hat in den letzten Jahren stark zugenommen, da sie offensichtlich an diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind.

1.2.1 Struktureller Aufbau von Calpainen

Calpaine sind intrazelluläre, nicht lysosomale, Ca^{2+} -abhängige Cysteineproteinasen, die aufgrund ihres Vorkommens in zwei Gruppen unterteilt werden: die *ubiquitären* (konventionellen) und *gewebespezifischen* Calpaine.

Die relativ gut beschriebenen **ubiquitären** Calpaine μ - und m-Calpain (bzw. Calpain I und II) sind nach der für ihre Aktivierung notwendigen Ca^{2+} -Konzentration benannt: Sie benötigen μM - bzw. mM - Ca^{2+} -Konzentrationen.

Beide Isozyme ähneln sich in vielen Eigenschaften. Sie sind Heterodimere und bestehen aus einer grossen katalytischen 80 kDa (80k) und einer kleinen regulatorischen 30kDa (30k) Untereinheit, wobei die 30k-Untereinheiten (268 Aminosäurereste) der beiden ubiquitären Calpaine identisch sind und die 80k-Untereinheiten (ca. 720 Aminosäuren), trotz hoher Ähnlichkeit geringfügige Unterschiede aufweisen. Diese in allen Calpainen ähnlichen 80k-Untereinheiten bestehen aus 4 Domänen (nachfolgend als I-IV benannt), deren Struktur den Calpainen ihren Namen gegeben haben, da IV dem Ca^{2+} -bindenden **Calmodulin** und II der Protease **Papain** entspricht. Der Domäne I wird eine Funktion als Propeptid zugesprochen, die die proteolytische Aktivität von Domäne II hemmen soll und während autokatalytischer Aktivierung N-terminal abgespalten wird. Domäne III kommt als calmodulinbindendes Protein zusammen mit Domäne VI ebenfalls eine inhibitorische Funktion zu. Nach der Bindung der beiden Domänen III und IV an Ca^{2+} wird Domäne II durch eine Konformationsänderung der gesamten Untereinheit aktiviert.

Die bei μ - und m-Calpain identische 30k-Untereinheit besteht aus 2 Domänen (IV' und V), einer Calmodulin-ähnlichen Domäne IV', die sehr homolog zur Domäne IV der 80k-Untereinheiten ist, und einer hydrophoben, Glyzin-reichen Domäne V, die eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Phospholipiden oder Zellmembranen spielt. Der genaue Interaktionsmechanismus der beiden Untereinheiten, speziell zwischen den Ca^{2+} -bindenden Domänen, ist noch nicht geklärt. Der kleinen 30k-Untereinheit wird jedoch eine Beteiligung an der Regulierung der Calciumsensitivität und Calpainaktivierung zugesprochen⁷.

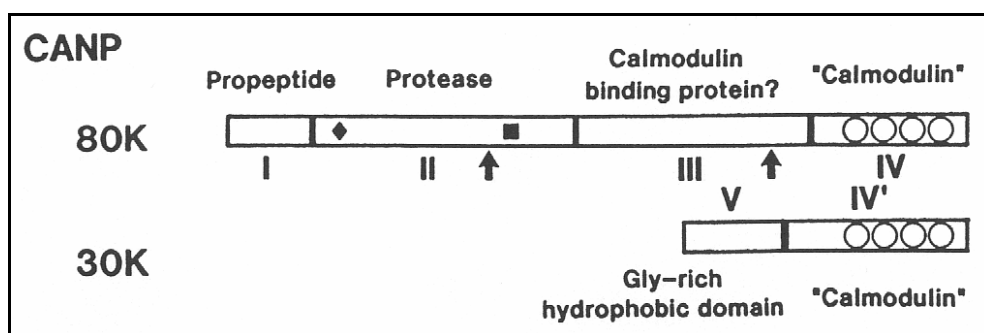


Abb. 1-2 Schematische Struktur von Calpain⁸

Ein drittes ubiquitär vorkommendes Calpain ist auf cDNA Ebene im Huhn 1995 von Sorimachi et al. identifiziert worden und wird aufgrund seiner Calciumsensitivität, die zwischen dem m- und dem μ -Calpain liegt, μ /m-Calpain genannt. Die 80k-Untereinheit dieses neuen Typs zeigt die grösste Sequenz-

Übereinstimmung mit der des m-Calpains und konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden⁹.

Die Bedeutung der erst seit Beginn der 90'er Jahre in einigen Säugetieren entdeckten gewebespezifischen Calpaine ist noch unklar. Diese Calpaine (auch: n-Calpaine) sind im Gegensatz zu den „konventionellen“ ubiquitären Calpainen nur in speziellen Geweben vorhanden. Das erste auf cDNA Basis sequenzierte n-Calpain ist das von Sorimachi et al. 1993 entdeckte Calpain 3 oder nCL-1 (für: novel calpain large subunit) oder p94 (nach seinem Molekulargewicht), das ausschliesslich in quergestreifter Skelettmuskulatur vorkommt¹⁰. In der molekularen Struktur der grossen Untereinheit des nCL-1 Calpains finden sich im Unterschied zu den μ - und m-Calpainen drei zusätzliche Segmente: NS, IS1 und IS2 (s.Abb. 1.2). nCL-1 steht im Verdacht nach Genmutation zur seltenen, autosomal rezessiven Beckengürtel-Muskeldystrophie des Typs 2A zu führen¹¹. Ausserdem wird vermutet, dass nCL-1 eine wichtige Rolle in der Muskelzelldifferenzierung spielt¹².

Desweiteren wurden gewebespezifische Calpaine, wie nCL-2 und nCL-2' im glatten Muskel des Magens¹⁰, nCL-4 im Gastrointestinaltrakt^{13; 14}, sowie andere Calpain-ähnliche Proteine aus *Drosophila melanogaster*, *Schistosoma mansoni* und *Aspergillus nidulans*¹⁵ entdeckt. Die Funktion dieser Proteine ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

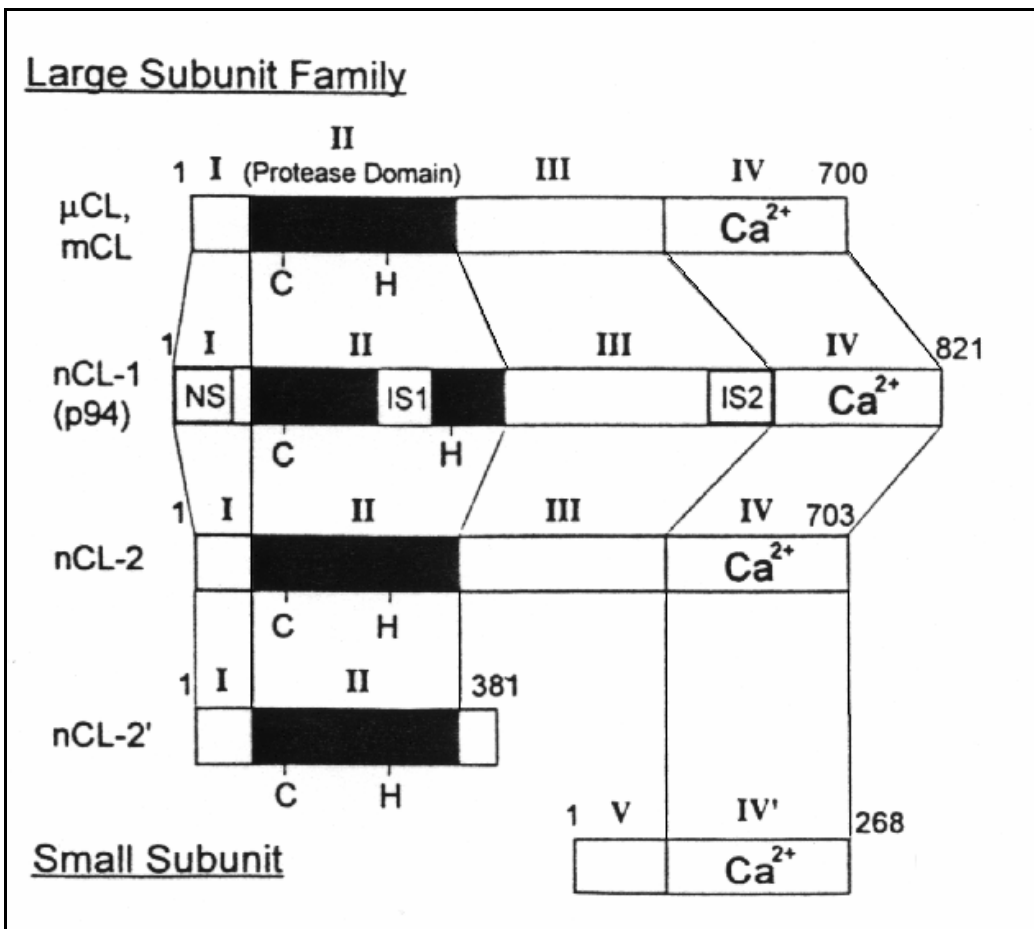


Abb. 1.2.1-1 Schematische Struktur von ubiquitären und gewebespezifischen Calpainen¹²

1.2.2 Aktivierung von Calpain und dessen Nachweis

Durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration soll es zu einer autokatalytischen Konformationsänderung des Calpainmoleküls kommen, die das zunächst inaktive Proenzym durch Abspaltung der Propeptid-Domäne I der 80k-Untereinheit aktiviert. Gleichzeitig soll Autokatalyse der „regulatorischen“ 30k-Untereinheit zu Interaktionen mit Phospholipiden an der Zellmembran führen, die einerseits die proteolytische Aktivität des aktiven Calpains beschleunigen, andererseits die zur Aktivierung benötigte Calciummenge reduzieren soll. Die Anwesenheit beider Untereinheiten ist für den Aktivierungsmechanismus essentiell. Suzuki et al. wiesen nach, dass nach Stimulation der 80k-Untereinheit in Abwesenheit der 30-k Untereinheit mit einer halbmaximalen Aktivierungsdosis Calcium eine Enzymaktivität der 80-k Untereinheit von nur 5%, an Stelle der 50% Aktivität beider Untereinheiten, erzielt werden konnte¹⁶. Die halbmaximale Aktivierungsdosis in in vitro Tests liegt für μ -Calpain bei 10-100 μ M und für m-Calpain bei 150-800 μ M Calcium¹⁷. Diese Konzentrationen

sind unter physiologischen Bedingungen wesentlich niedriger, was zeigt, dass noch andere Faktoren an der Aktivierung beteiligt sein müssen¹⁶. Die Calpainaktivierung führt zur Spaltung von Cytosklett- und Membranproteinen, was letztlich zum Zelltod führen soll¹⁸. Welche Zellbestandteile den Calpainen als Substrat dienen, bzw welches Erkennungs- und Spaltungsmotiv zu Grunde liegt, ist im wesentlichen noch nicht geklärt. Bislang wies man Spaltung folgender Proteingruppen nach (Reviews: Saido et al. 1994, Kawasaki et al. 1996)^{12; 19}:

- **Zytoskelettale Proteine:** Actin-bindende Proteine (Fodrin/Spectrin, Talin, Filamin, α -Actinin) und Microtubuli assoziierte Proteine
- **Membranproteine:** Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle (Integrin, Cadherin, N-Cam), Ionen-Transporter (Calcium-ATPase)
- **Enzyme:** Kinasen (Protein Kinase C, Calcium/Calmodulin abhängige Protein Kinase IV), Phosphatasen (Protein Tyrosin Phosphatase 1B, Phosphorylase Phosphatase), Phospholipase (Phospholipase C)
- **Andere Proteine:** Cytokine (Interleukin 1 α), Crystallin, Transkriptionsfaktoren (Fos, Jun), Tumorsuppressoren (p53)
- **Synthetische Substrate:** 4-Methylcoumaryl-7-amid (AMC) Derivate mit Aminosäurerest (Suc-Leu-Tyr, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr, etc)

Dabei scheint es keine Unterschiede bezüglich der Substratspezifität zwischen den μ - und m-Calpainen zu geben. Allerdings finden sich auf Aminosäuresequenzebene bevorzugte Angriffsorte zwischen Arg, Tyr oder Met Aminosäuren in Position P1 und den Aminosäuren Leu oder Val in der Position P2, wobei es zahlreiche Ausnahmen gibt²⁰.

Zum Nachweis der Calpainaktivität werden seit Jahren synthetische Substrate verwendet. Von besonderem Interesse sind hier solche Substrate deren Spaltprodukte nach Spaltung durch Calpain mittels Fluoreszenzspektrometrie nachgewiesen werden können, während das eigentlich Substrat nicht oder nur kaum fluoresziert. Diese Aktivitätsnachweismethodik wurde schon in einigen in vitro-Tests angewendet²¹⁻²⁴, während deren Verwendung in Tiermodellen selten ist. So wurde von Kohli et al. am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber die Verwicklung der Calpaine in die Pathogenese des Reperfusionsschadens, unter Verwendung des spezifischen Calpaininhibitors Cbz-Val-Phe-Methyl-

esther und Aktivitätsmessung durch Zugabe von SLLVY-AMC, untersucht. Hier konnte durch diese Technik eine Aktivitätsminderung durch Calpaininhibition, sowie eine signifikant niedrigere Leberschädigung durch Messung und Vergleich der biliären Flussrate und der Aspartataminotransferase (GOT, AST), nachgewiesen werden²⁵.

1.2.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Calpainen

Zur Zeit wird die hauptsächlich modulierende physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Calpainfamilie in Säugetierzellen, in Tiermodellen und bei bestimmten humanen Erkrankungen diskutiert. In verschiedenen Übersichtsarbeiten wird auf die Relevanz von Calpainen beim „cell-remodeling“, dem Auf- und Umbau des Zytoskeletts, hingewiesen. Calpaine sollen diesbezüglich zum Beispiel an folgenden physiologischen Vorgängen beteiligt sein:

- Differenzierung von Muskelzellen^{26, 27}
- Fusion von Myoblasten^{28, 27}
- Regulation des Zellzyklus²⁹
- Zellwachstum^{30, 31}
- Metabolismus in Nervenzellen³²
- Plättchen-Aktivierung^{33, 34}

Interessant erscheint vor allem die Beteiligung der Calpaine an der Apoptose, dem programmierten Zelltod, bei der es unter anderem zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration und der proteolytischen Spaltung bestimmter Bestandteile des Zytoskeletts kommt³⁵.

Squier et al. untersuchte den Einfluss von Calpainen nach Dexamethason-induzierter Apoptose an Thymozyten und fand heraus, dass durch Hemmung des aktivierten Calpains mittels verschiedener Calpaininhibitoren die Apoptose im Thymozytenmodell verhindert werden kann^{36, 37}.

Auch Nath et al. wiesen eine Calpainaktivierung in SH-SY5Y Neuroblastomzellen während Apoptose nach und beschrieben ebenfalls einen protektiven Effekt durch Calpainhemmung^{38, 39}.

Neueste Untersuchungen von Debiasi et al. bei Reovirus-induzierter Apoptose an Fibroblasten zeigen ebenfalls eine durch Calpaininhibitoren hemmbare

Calpainaktivität, die in den Untersuchungen in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten zytoplasmatischen Calciumkonzentration steht⁴⁰.

Der Einfluss der Ca^{2+} -abhängigen Proteasen wird ebenfalls von verschiedenen Autoren in Zusammenhang mit ischämie-/reperfusion-induzierten nekrotischen und apoptotischen Prozessen an diversen Organsystemen, wie zum Beispiel am Modell einer Totalischämie an Rattenlebern⁴¹, im Tubulussystem von Ratten⁴², in Neuronen des ZNS⁴³⁻⁴⁵ und an Zellkulturen von Kardiomyozyten neugeborener Ratten beschrieben^{21; 46}.

Eine gesicherte pathophysiologische Rolle der Calpaine wurde im Zusammenhang mit Muskeldystrophien beschrieben. Sie ist vor allem bei der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne¹⁷ und der selteneren Beckengürtel-Muskeldystrophie Typ 2a¹¹ von Bedeutung.

Desweiteren diskutiert man eine Beteiligung der Calpaine an neurodegenerativen Erkrankungen im ZNS, wie zum Beispiel bei Morbus Alzheimer⁴⁷ und Parkinson⁴⁸. Shields et al. zeigten in experimentell induzierter Encephalomyelitis eine Verwicklung der Calpaine in die Pathogenese demyelinisierender Erkrankungen wie Multiple Sklerose^{48; 49}.

Eine überproportionale Calpainaktivierung soll eine mögliche Ursache der Katarakt-Bildung in Augenlinsen sein. Zu diesem Ergebnis kommen Kadoya et al. nach Vorbehandlung von Linsenzellkulturen der Ratte mit H_2O_2 und Verwendung eines Calpain-Inhibitors⁵⁰.

Zusammenfassend sei gesagt, dass die pathophysiologische Bedeutung der Calpaine, sowie deren Verwicklung in die Pathogenese anderer Krankheiten, erst im Ansatz erforscht ist.

1.2.4 Calpain-Inhibitoren und deren protektive Effekte

Alle in Kap. 1.2.3 geschilderten Untersuchungen zeigen, dass Calpaine und deren Aktivierung wichtige Bestandteile physiologischer und vor allem pathophysiologischer Vorgänge der Zelle und des Zellzyklus sind. Ihre Erforschung erscheint um so dringlicher, da wichtige protektive Effekte durch Inhibition dieses Calpainsystems vielfach beschrieben sind und sich dadurch möglicherweise therapeutische Ansätze ableiten lassen. Bisher sind daher schon einige synthetische und endogene Inhibitoren verwendet und näher

erforscht worden. Der ideale und hochspezifische Inhibitor der Calpaine ist der physiologische Antagonist Calpastatin, der eine hohe Affinität und strikte Spezifität zu den Calpainen aufweist. Eine Basisaktivität dieses Inhibitors ist in den meisten Geweben nachweisbar und entspricht unter physiologischen Bedingungen der des Calpains, so dass sich beide Enzymsysteme in einem relativen Gleichgewicht befinden. Da es sich bei Calpastatinen jedoch um Enzyme mit relativ hohem Molekulargewicht handelt, die daher nicht zellgängig sind, scheidet die Anwendung im Tiermodell aus. Als endogene Inhibitoren werden ausserdem das Kininogen und α 2-Makroglobulin diskutiert, deren Rollen jedoch noch weitgehend unklar sind^{12; 51; 52}.

Da es sich beim Calpainsystem um ein zellständiges Enzymsystem handelt, ist die Permeabilität der Zellmembran für einen synthetischen Inhibitor von besonderer Bedeutung. Ausserdem sind alle bisher entdeckten synthetischen Inhibitoren nicht sehr selektiv, da sie teilweise andere intrazelluläre Enzymsysteme, wie zum Beispiel Cathepsine oder Papain, ebenfalls inhibieren. Ein solcher niedermolekularer, synthetischer Inhibitor mit ähnlich hoher Affinität und vergleichbarer Selektivität zu der des Calpastatins ist bisher noch nicht beschrieben worden. Daher sollten tierexperimentelle Versuche unter diesen Voraussetzungen vorsichtig interpretiert werden.

Treffende Beispiele für die protektiven Effekte von Calpain-Inhibitoren am Herzmodell, in diesem Fall des Calpain-Inhibitor-I (N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-norleucinal), sind die 1999 von den Gruppen Iwamoto et al. und Saito et al. veröffentlichten Untersuchungen.

Iwamoto et al. demonstrierten am Ganztiermodell der Ratte, durch 30 minütige Ligation der linken Koronararterie und nachfolgender 6-stündiger Reperfusionsphase, eine um ca. 50% reduzierte Infarktgrösse der Versuchsgruppe mit Calpain-Inhibitor-I im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei ist zu beachten, dass der Calpain-Inhibitor zu Beginn des Versuches dem Perfusat zugegeben wurde. Dieses Ergebnis konnte nach Zugabe des Inhibitors erst zu Beginn der Reperfusionsphase in einer zweiten Kontrollgruppe, unter sonst gleichen Versuchsbedingungen, nicht erzielt werden⁵³. Auch Saito et al. beschrieben diesen protektiven Effekt am Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens nach 12h hypothermischer Konservierung. Die mit Calpain-Inhibitor-I vorbehandelten Herzen wiesen im Vergleich zu den unbehandelten eine

bessere Herzfunktion, sowie eine geringere Freisetzung herzspezifischer Metabolite (CK, LDH und GOT), auf⁵⁴.

2 Fragestellung

Im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 3 und 4) soll am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens nach Langendorff der pathophysiologische Einfluss von Ca^{2+} -abhängigen Cysteinproteinasen, insbesondere der ubiquitären Calpaine, in vivo untersucht werden.

Dazu wurden bei den Kaninchenherzen normotherme Globalischämien durchgeführt, da es unter ischämischen Bedingungen in Verbindung mit einer gesteigerten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Calpainaktivierung kommt (s. 1.2.3). Ausserdem wurden Lipopolysaccharide (s. 3.5.1) mit dem Ziel einer zusätzlich verstärkten Calpainaktivierung etwa im Rahmen einer Sepsis appliziert und die Auswirkungen einer Calpaininhibition untersucht. Zur Calpaininhibition wurde der Calpaininhibitor CAL425 (s. 3.5.2) verwendet.

Bei diesen Versuchen sollte die Herzfunktion der Kaninchenherzen in den verschiedenen Versuchsgruppen untersucht und miteinander verglichen werden. Als Messparameter dienten hierbei die linksventrikuläre auxotonische Kontraktionsamplitude, der gesamt-koronare Widerstand und die Koronar-perfusion, sowie die Freisetzung der Metaboliten Kreatinphosphokinase und Lactat-Dehydrogenase (s. 3.4).

Der zweite Teil dieser Arbeit (s. Kap. 5 bis 7) ist der Versuch einer Quantifizierung der Calpainaktivität in vitro und der Nachweis dieser Aktivität in vivo am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens nach Langendorff mittels fluoreszenzspektroskopischer Untersuchung.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Organspender dienten 102 Bastard-Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 2700 bis 3300 g. Die Versuchstiere wurden über die Firma Behring-Werke Marburg bezogen. Die Organentnahmen wurden dem Regierungspräsidium Giessen angezeigt und gemäss dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.2 Organentnahme

Zur Applikation der Medikamente wurde dem Tier zunächst eine Ohrvene mit einer 25G Butterfly kanüliert. Zur Koagulationsprophylaxe wurden dann 1000 I.E. Heparin (Liquemin® N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen) pro kg KG i.v. injiziert. Dann wurde die Narkose mit im Verhältnis 1:5 verdünntem Narcoren® (Pentobarbital-Na, Rhone Merieux GmbH, Laupheim) eingeleitet. Dies erfolgte durch langsame Injektion von ca. 2 ml (ca. 133 mg pro kg KG) der verdünnten Narcoren®-Lösung unter Beibehaltung der Spontanatmung des Tieres. Nach Fixierung des Tieres in Rückenlage und prätrachealer Enthaarung erfolgte die Lokalanästhesie dieses Bereichs durch s.c. Injektion von 10 ml Xylocain® 2% (Lidocainhydrochlorid, Astra GmbH, Wedel). Anschliessend wurde der gesamte Thorax und das Abdomen des Tieres enthaart. Nach ausreichender Einwirkzeit der Lokalanästhesie wurde die Trachea freipräpariert und nach Umschlingung mit einer Ligatur inzidiert. In die Trachea wurde ein Kunststofftubus (I.D. 3,5 mm) eingeführt. Die kontinuierliche Beatmung des Tieres mit Raumluft erfolgte über eine Starling-Pumpe (Fa. Braun, Melsungen) mit folgenden Parametern: 40 Atemzüge/min, 25 ml Atemzugvolumen, PEEP von 1 cm H₂O. Anschliessend wurde die Narkose mit Narcoren® solange vertieft, bis keine Schmerzreaktionen mehr auslösbar waren. Durch Rippenbogenrandschnitte beiderseits, ventro-laterale Diaphragma-Ablösung am Rippenbogen und mediane Sternotomie erfolgte der Zugang zu den Thoraxorganen. Der Thymus wurde stumpf abpräpariert, das Perikard eröffnet und zum Teil reseziert, des weiteren wurde die V. cava superior, V. cava inferior und Aorta ascendens mit einer Ligatur lose angeschlossen.

Danach wurde das mobilisierte Endstück des Kathetersystems zur retrograden aortokoronaren Perfusion (I.D. 0,3 cm) mit 4°C kalter kardiopleger Lösung nach Bretschneider (Custodiol®, Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein) luftblasenfrei gefüllt.

Zur nachfolgenden Entnahme des Herzens wurden die Ligaturen um die Vena cava superior et inferior zugezogen, um den venösen Rückfluss zum Herz zu unterbinden. Dann wurde die Aorta ascendens quer inzidiert. Der Katheter wurde in das Lumen vorgeschoben, ohne die Koronarostien zu verlegen oder die Aortenklappe zu irritieren. Der Aortenstumpf wurde nun mit Hilfe einer Ligatur am Katheter fixiert. Anschliessend wurde die Perfusion mit der kardioplegen Lösung begonnen und zur Druckentlastung des Koronarsystems die Vena cava superior et inferior und Vena pulmonalis inzidiert. Das Herz wurde bis zum völligen Herzstillstand perfundiert.

Nach Absetzen der Tachea und Freipräparation aus dem Mediastinum wurden Herz und Lunge am Perfusionskatheter freihängend im Perfusionssystem befestigt und zusätzlich durch eine Krokodilklemme, die am Bindegewebe des rechten Vorhofes angebracht wurde, fixiert. Es folgte das Abpräparieren der Lungen und das Eintauchen des Herzens in ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefülltes Gefäss, um das Herz vor Luftembolisationen zu schützen. Nach Inzision des linken Vorhofs und der Mitralklappensegel wurde ein kollabierender Latex-Ballonkatheter (Hugo Sachs Elektronik KG, March; Grösse 12, Volumen 1,3 ml) zur Druckmessung im linken Ventrikel platziert (Abb. 3-1).

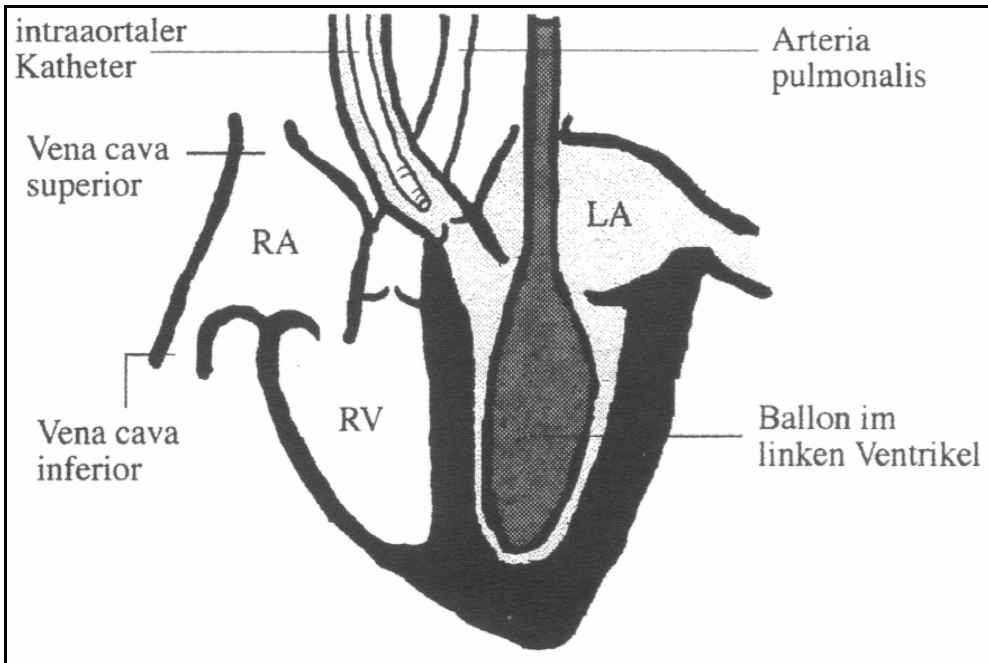


Abb. 3-1 Schematische Darstellung des isolierten retrograd perfundierten Herzens

Um ein Herausgleiten des Ballonkatheters zu verhindern, wurde der linke Vorhof mit zwei Ligaturen an der Krokodilklemme fixiert. Der mobilisierte Aortenkatheter wurde wieder an das Perfusionssystem angeschlossen und das Herz in einen mit Perfusat gefüllten Behälter („Perfusatbad“) eingetaucht.

Nach dieser ca. dreiminütigen Ischämie wurde mit der retrograden Perfusion des Herzens mit einem konstanten Druck von 70 mmHg begonnen. Zum kontinuierlichen Monitoring wurde ein bipolares EKG mit einer Elektrode an der Krokodilklemme und einer zweiten Elektrode im Perfusatbad auf Höhe der Herzspitze angebracht. Ausserdem wurde ein Thermometer (Testotherm, 1100 sec-thermometer) zur Temperaturmessung im Perfusatbad angebracht. Der linksventrikuläre Latexballon wurde in der Vorlaufphase des Versuchs mit einem Druck von 7 mmHg entfaltet und die isovolumetrische Kontraktion gemessen. Nach kurzer Eingewöhnung des Ventrikels an den Ballon wurde das Ballonsystem auf auxotone Kontraktion mit konstanter Vorlast von 7 mmHg eingestellt (siehe 3.3). Nach Erreichen einer physiologischen Temperatur von 37°C begann der Versuch.

Das verwendete Schlauchsystem bestand aus Polyethylen- (Bentley By Pass[®], Tubings Inc.) und Silikonschläuchen (Deutsch & Neumann).

Die Präparationszeit von Narkotisierung des Kaninchens bis zum Einhängen des Herzens in das Modell betrug durchschnittlich 20 Minuten.

3.3 Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzens

Das hier verwendete System basiert auf dem von Langendorff erstmals verwendeten Modell des isolierten, retrograd aortokoronar perfundierten Herzens. Dabei kann das isolierte Herz entweder mit konstantem Flow (Durchfluss/Zeit) oder Druck perfundiert werden. Da der Flow als Messparameter zur Erfassung des koronaren Gefässwiderstandes verwendet wurde, perfundierten wir mit konstantem Druck von 70 mmHg.

Das Perfusionssystem (Abb. 3-2) wurde aus einem doppelwandigen Perfusatbehälter mit 5 Litern Fassungsvermögen gespeist. In dem Perfusatbehälter befand sich ein an eine Gasaustauscheinheit angeschlossener Bubbler, durch den eine Äquilibration mit Sauerstoff und Kohlendioxid auf einen Sauerstoffpartialdruck von 500-600 mmHg und einen Kohlendioxidpartialdruck von 12-16 mmHg erfolgte. Ein pH-Wert im Perfusat von 7,4-7,45 wurde durch variable Regulierung des Kohlendioxidpartialdrucks erreicht. Der pH-Wert wurde während des gesamten Versuches regelmässig in festgelegten Zeitabständen kontrolliert, um eine pH-Wert Entgleisung zu vermeiden. Diese Messungen wurden mit einem ABL330 (Radiometer GmbH, Willich) durchgeführt.

Das Perfusat wurde mittels einer Rollerpumpe ip-12 (Fa. Ismatec, Zürich, Schweiz) in den in der Aorta ascendens liegenden Perfusionskatheter mit einem Flow von 50 ml/min gepumpt. Zwischengeschaltet wurde ein 40 μ m Mikrofilter (Pall Blood Transfusion Filter SQ 40SE, Pall Biomedical, Portsmouth, England), der nur einmal verwendet wurde und für jeden Versuch neu eingebaut wurde.

Nach diesem Filter folgte ein über einen Dreiwegehahn angeschlossener Überlauf, der überschüssiges Perfusat abfing und über einen Schlauch zurück zum Perfusatbehälter leitete. Mit Hilfe dieses höhenverstellbaren Überlaufs konnte man zu Beginn jedes Versuches den konstanten Systemdruck von 70 mmHg einregulieren.

Nach dem Überlauf zwischengeschaltet waren eine Blasenfalle, die Luftblasen aus dem System filterte, und ein Flowmeter (Messkopf: Blood Flow Transducer 300A, Fa. Empco, USA; Verstärker: Blood Flowmeter SP 2202, Fa. Gould,

USA), zur phasischen Durchflussmessung basierend auf den Messprinzipien der elektromagnetischen Induktion.

Auf das Flowmeter folgte ein Dreiwegehahn, über den mit Hilfe einer Rollenquetschpumpe BP742 (Fa. Fresenius Apparatebau, Bad Homburg) Medikamente oder Substrate dem Perfusat beigemischt werden konnten.

Der Aortenperfusionsdruck wurde über einen im Aortenstumpf liegenden Perfusionskatheter in Verbindung mit einer Messeinheit (Combitrans[®] Monitoring-Set, Fa. Braun, Melsungen) kontinuierlich gemessen.

Die Messung des linksventrikulären Druckes erfolgte ebenfalls über eine Combitrans[®] Messeinheit, die an den Latex-Ballonkatheter angeschlossen war. Der Ballonkatheter war über einen Dreiwegehahn mit einem Schlauchsystem verbunden. Dieses Schlauchsystem bildete einen durch Kugelventile flussgerichteten Kreislauf, indem Wasser synchron zur Ventrikelkontraktion im Sinne eines „working heart“ zirkulierte. Mit einem zwischengeschalteten, höhenverstellbaren Wasserreservoir konnte man zu Beginn eines jeden Versuches den Vorlastdruck im Ballon auf 7mmHg einstellen. Ausserdem konnte man mit diesem System entweder eine isovolumetrische oder eine auxotonische Ventrikelkontraktion einstellen.

Das durch die Koronararterien fließende Perfusat sammelte sich anschliessend via Sinus coronarius im Perfusatbadbehälter, indem das Herz während des Versuches frei beweglich hing. Dieser Perfusatbadbehälter war von einem doppelwandigen temperierten Glasbehälter mit Abflussmöglichkeit umgeben. Das Perfusat floss aus dem Perfusatbadbehälter in diesen Glasbehälter. An seinem Abfluss konnten Perfusatsammelproben entnommen werden. Der Rest des Perfusates wurde verworfen.

Die doppelwandigen Gefässe dieses Systems (Glasbehälter, Perfusatresevoir und Blasenfalle) wurden zur Temperaturstabilisierung durch ein Thermostatsystem (Thermomix UB, Fa. Braun, Melsungen), in dem Aqua dest. zirkulierte, erwärmt. Die Temperatur wurde im Perfusatbad durch ein Thermometer (Testotherm, 1100 sec-thermometer) gemessen und auf 37°C einreguliert.

Das kontinuierlich Monitoring von Aortenperfusionsdruck und Ventrikelkontraktionsamplitude erfolgte mit Hilfe einer Druckmesseinheit (Fa. Hellige, Freiburg). Die Daten der Druckmesseinheit, des Flowmeters und des

Elektrokardiogramms wurden mittels eines Acht-Kanal-EKG-Schreibers UD210 (Uniscrypt, Fa. Picker, München) registriert.

Das Schlauchsystem bestehend aus Polyethylen- (Bentley By Pass[®], Tubings Inc.) und Silikonschläuchen (Deutsch & Neumann), sowie sämtliche Behälter und Gefäße wurden zu Beginn und am Ende eines jeden Versuches ausreichend gereinigt und gespült.

3.3.1 Perfusionslösung

Zur Perfusion der Koronararterien wurde eine Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung verwendet. Durch Zusammenmischen von vier Stammlösungen und unter Zugabe von Pyruvat ($C_3H_3O_3Na$) erhielt man eine pH-neutrale Perfusionslösung deren pH-Wert während des Versuches durch Regulierung des Kohlendioxidpartialdruckes im physiologischen Bereich zwischen 7,4 und 7,45 gehalten wurde.

Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-HAES Puffers:

Lösung A	Hydroxyethylstärke 10%	650 ml
Lösung B	Glucose 10%	25 ml
Lösung C	Natriumbicarbonat 0,9%	86,6 ml
Lösung D	Elektrolytlösung	200 ml
Pyruvat		0,5 g

Zusammensetzung der Elektrolytlösung (Lösung D):

NaCl	7,16g/l Aqua dest.
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,75 g/l Aqua dest.
KH ₂ PO ₄	0,75g/l Aqua dest.
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,35 g/l Aqua dest.
KCl	1,26 g/l Aqua dest.

3.4 Versuchsmonitoring

3.4.1 Kontinuierliches Monitoring

Während aller Versuche wurden folgende Parameter kontinuierlich gemessen:

- Herzfrequenz (hf; Schläge/min)
- Systolischer Druck (P_{sys} ; mmHg)
- Diastolischer Druck (P_{dia} ; mmHg)
- Aortenperfusionsdruck (P_{aorta} ; mmHg)
- Koronardurchblutung (flow; ml/min)

Diese Parameter wurden mit Hilfe der installierten Messeinheiten gemessen und mittels eines Acht-Kanal-EKG-Schreibers UD210 (Uniscrypt, Fa. Picker, München) registriert. Diese Messprotokolle wurden nach den Versuchen einheitlich ausgewertet und mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung miteinander verglichen.

Ausserdem wurde kontinuierlich die Temperatur im Perfusatbad durch ein Thermometer (Testotherm, 1100 sec-thermometer) gemessen (temp; °C).

Aus den registrierten Daten lassen sich folgende Parameter ableiten:

- Linksventrikuläre Kontraktionsamplitude (amp)

$$\text{amp} = P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}} \quad [\text{mmHg}]$$

- Relative Linksventrikuläre Kontraktionsamplitude (amp%)

$$\text{amp}\% = (\text{amp} \times 100) / \text{AmpMW5-15}^* \quad [\%]$$

* wobei AmpMW5-15 aus den Mittelwerten der Linksventrikulären Kontraktionsamplituden (5, 10 und 15 min nach Versuchsbeginn) in der steady-state-Phase ermittelt wird (s. 3.6.)

- Koronardurchblutung pro Gramm Herzgewicht (flq)

$$\text{flq} = \text{flow} / \text{hw}^* \quad [\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}]$$

* wobei hw dem Mittelwert der Herzgewichte von 10g entspricht

- Koronarer Gesamtwiderstand (W_{cor})

$$W_{\text{cor}} = \Delta p / i = P_{\text{aorta}} / \text{flq} \quad [\text{mmHg} \times \text{min} \times \text{g} \times \text{ml}^{-1}]$$

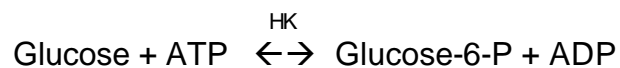
3.4.2 Diskontinuierliches Monitoring

Während aller Versuche wurden zu festgelegten Zeitpunkten Perfusatproben entnommen. Zur Bestimmung von pH-Wert, pO₂ (mmHg) und pCO₂ (mmHg) wurden Proben aus dem präkardialen (arteriellen) Schlauchsystem entnommen. Diese Proben wurden mittels eines Blutgasanalysegerätes ABL 330 (Radiometer GmbH, Willich) ausgewertet.

Ausserdem wurden Proben aus dem postkardialen (venösen) System zur Bestimmung der herzspezifischen Metabolite Kreatinphosphokinase (CK) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) nach einem festgelegten Zeitschema (s. 3.6.) entnommen.

3.4.3 Bestimmung der Kreatinphosphokinase (CK)

Die Bestimmung der Kreatinphosphokinase (CK) erfolgte gemäss der Standardmethode 94 nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (1977) und der International Federation of Clinical Chemistry (1990) im Institut für Klinische Chemie. Die in vitro Tests wurden mittel eines klinisch-chemischen Analysenautomaten (BoehringerMannheim/Hitachi) nach folgendem Testprinzip durchgeführt:



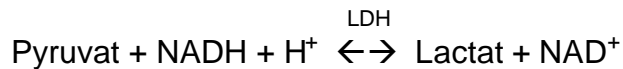
G6P-DH



Bezogen auf äquimolare Mengen verläuft die Bildung von NADPH und Creatin mit der gleichen Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit der photometrisch gemessenen NADPH-Bildung ist der CK-Aktivität proportional.

3.4.3 Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) erfolgte gemäss der „Optimierten Standard-Methode“ nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1972 im Institut für Klinische Chemie. Die in vitro Tests wurden mittel eines klinisch-chemischen Analysenautomaten (BoehringerMannheim/Hitachi) nach folgendem Testprinzip durchgeführt:



Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. Dabei wird NADH zu NAD oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional der LDH-Konzentration und wird photometrisch gemessen.

3.5 Verwendete Substanzen

3.5.1 Lipopolysaccharide

Während einiger Versuche (s. 3.6.1) wurden über den aortokoronaren Katheter Lipopolysaccharide (LPS) zugeführt. In vivo spielen LPS eine grosse Rolle bei der Entstehung des septischen Schocks, dem SIRS (systemic inflammatory reaction syndrome) und der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC). LPS sind Hauptbestandteile der Zellwand von Gram negativen Bakterien und stimulieren über Mediatoren wie Interleukin 1, Tumornekrosefaktor und andere Zytokine humorale und zelluläre Kaskaden des Immunsystems. LPS sind hochgradig pyrogen. Durch Aktivierung von Komplementkaskade, Makrophagen und Granulozyten resultiert eine Vasodilatation und eine erhöhte Kapillarpermeabilität mit den Folgen einer Hypovolämie, Hypotension und Hypoxie. Durch die Hypoxie wird verstärkt ATP über die anaerobe Glykolyse gewonnen, wobei vermehrt Laktat gebildet wird. Durch die verminderte Gewebepfusion werden weitere Substanzen wie Gerinnungsfaktoren, Komplementfaktoren, Kinine, Zytokine, plättchenaktivierender Faktor (PAF), usw. frei.

Die in den Versuchen in einer nicht letalen Dosis zugeführten LPS (Best.-Nr.: L 2880, Fa. Sigma, Saint Louis, USA) dienten der Immunstimulation und stammen von Escherichia coli Bakterien des Serotyps 055:B5.

3.5.2 Calpain-Inhibitor

Der in diesem ersten Teil der Arbeit verwendete Calpain-Inhibitor CAL425 ($M_w=421,5$ kDa) ist ein synthetischer, wasserlöslicher Proteaseninhibitor (Stilben-Derivat) mit guter Gewebepenetration. CAL425 wurde mit freundlicher Genehmigung der Fa. BASF AG, Ludwigshafen, für unsere Versuche zur Verfügung gestellt. Durch die BASF AG wurden für CAL425 folgende Bindekonstanten ermittelt:

- Calpain I $K_i = 13$ nM
- Cathepsin B $K_i = 27$ nM
- Cathepsin L $K_i = 22$ nM

3.6 Versuchsdurchführung

Insgesamt 40 Versuche teilen sich in 4 Versuchsgruppen (VG1-4) mit jeweils 10 Kaninchen nach folgendem Schema auf:

VG1	n=10	Keine Ischämie	
VG2	n=10	30 min. Ischämie	
VG3	n=10	30 min. Ischämie	LPS Applikation
VG4	n=10	30 min. Ischämie	LPS Applikation und Verwendung eines Calpain-Inhibitors (CAL425) in Krebs-Henseleit-HAES Puffer

Tab. 3.6-1 Versuchsschemata VG1-VG4

Bei VG1 (n=10) wurde auf die Durchführung einer Globalischämie, sowie auf den Einsatz von Medikamenten verzichtet, um die unbeeinflusste Funktion der Herzen im Langendorff-Modell beurteilen zu können.

Der Versuchsablauf der VG1-4 stellt sich wie folgt dar:

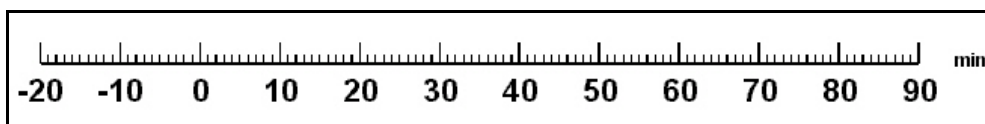


Abb. 3.6-1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes von VG1

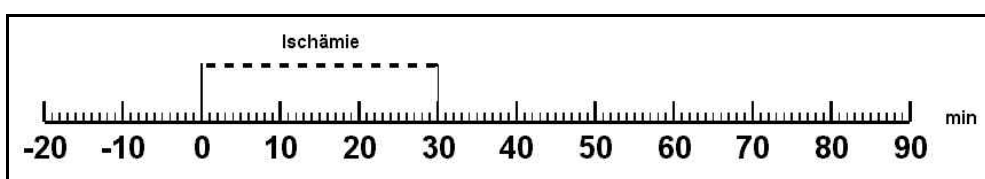


Abb. 3.6-2 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes von VG2

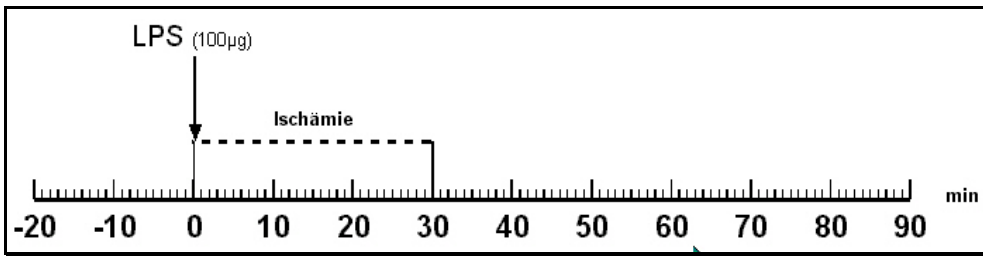


Abb. 3.6-3 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes von VG3

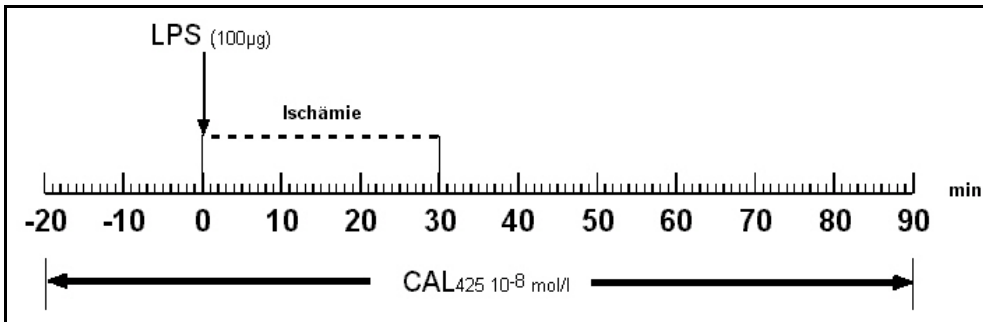


Abb. 3.6-4 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes von VG4

Wie aus den schematischen Darstellungen zu erkennen ist, erfolgt der eigentliche Versuchsbeginn zur Minute 0 nach einer Vorlaufzeit von 20 Minuten. Diese Vorlaufzeit, auch „steady-state-period“ genannt, bezeichnet eine Phase, in der sich die Messparameter innerhalb vordefinierter Grenzen befinden. Dies setzt einen physiologischen pH-Wert von 7,4-7,45, sowie einen Sauerstoffpartialdruck von 500-600 mmHg und einen Kohlendioxidpartialdruck von 12-16 mmHg voraus.

Die Versuche der VG 2-4 begannen zur Minute 0 mit einer vollständigen Unterbrechung der Perfusatzufuhr zur Simulation einer Globalischämie. Bei VG3 und VG4 wurde gleich im Anschluss an die Unterbrechung der Perfusatzufuhr LPS als Bolus über den aortakoronaren Katheter injiziert. Der Bolus bestand aus 100µg LPS (s. 3.5.1) gelöst auf 5ml Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (Endkonzentration=20µg/ml) und verblieb während der Ischämiezeit aufgrund der unterbrochenen Perfusion in den Koronargefäßen. Bei VG4 wurde dem Perfusat ein Calpain-Inhibitor (s. 3.5.2) hinzugefügt, so dass während der gesamten Versuchszeit der Calpain-Inhibitor in einer Endkonzentration von 10^{-8} mol/l angeboten wurde.

Während der Versuche wurden bei allen 4 Versuchsgruppen Proben aus dem postkardialen (venösen) System zur Bestimmung der herzspezifischen Metabolite Kreatinphosphokinase (CK) und Lactat-Dehydrogenase (LDH)

gesammelt. Die Sammelperioden dauerten jeweils 5 Minuten und verliefen für VG1-4 nach folgenden Schemata:

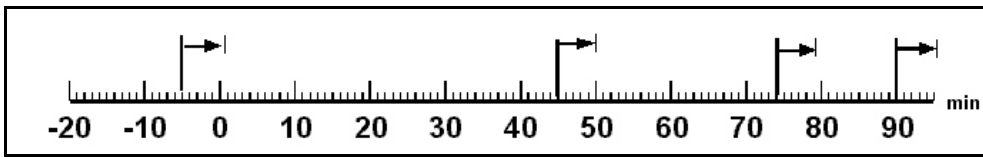


Abb. 3.6-5 Schematische Darstellung der Sammelperioden VG1

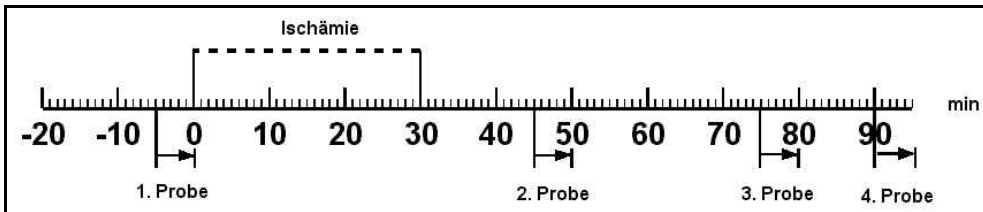


Abb. 3.6-6 Schematische Darstellung der Sammelperioden VG2-4

Die Perfusatproben wurden in Eppendorf-Hütchen abpipettiert und bis zur späteren Bestimmung im Institut für Klinische Chemie bei -25°C tiefgefroren.

3.7 Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem Fisher's multiple-comparison Test (least significant differences, LSD) mit Hilfe des PC-Programmes Statgraphics PLUS for Windows 3.1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt durch Mittelwert \pm Standardfehler (SE). Ein p-Wert <0.05 stellt ein signifikantes Ergebnis dar. Die graphische Aufbearbeitung erfolgte mit dem PC-Programm Stanford Graphics Version 3.0.

4 Zwischenergebnis

4.1 Auswertung der Ergebnisse des kontinuierlichen Monitoring

Zu Beginn der Versuche am Modell des isoliert-perfundierten Kaninchenherzens wurden Versuche in einer Kontrollversuchsreihe (VG1) zur Dokumentation der Stabilität der herzspezifischen Parameter ohne Ischämie und Substanztestung durchgeführt. Hierbei lag der Mittelwert der auxotonen linksventrikulären Druckamplitude (amp) zu Beginn der Versuche bei $80,3 \pm 6,7$ (SE) mmHg, der Koronarwiderstand (W_{Cor}) bei $2,57 \pm 0,13$ mmHg x min x g x ml⁻¹, die Herzfrequenz (hf) bei $185,8 \pm 9,4$ min⁻¹ und der Aortenperfusionsdruck (P_{Aorta}) bei $72,3 \pm 1,2$ mmHg. Die Varianzprüfung (Bartlett's Test) und ANOVA ergab für obige Messparameter zu Versuchsbeginn keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den Einzelversuchen, so dass zum Versuchsbeginn von einer gleichen Grundgesamtheit ausgegangen werden kann und die Betrachtung von relativen Veränderungen durch Gruppenvergleich möglich ist. Dasselbe gilt für die Messparameter in den Versuchsgruppen 2 bis 4 in der steady-state Periode vor dem Beginn der Ischämie (s. Tab. 4.1-1). Hierbei ist ausserdem zu beachten, dass im Versuchsmodell der Aortenperfusionsdruck (P_{Aorta}) bei ca. 70 mmHg konstant gehalten wurde.

Die gemessenen Werte sind in Tabelle 4.1-1 dargestellt. Es ist ausserdem der Mittelwert der auxotonen linksventrikulären Kontraktionsamplitude Amp_{MW5-15} angegeben, auf dessen Basis sich die relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude (amp%) berechnen lässt (s.3.4.1). Amp_{MW5-15} setzt sich aus den gemittelten Werten der auxotonen linksventrikulären Kontraktionsamplitude zur 5., 10. und 15. Minute nach Versuchsbeginn zusammen und markiert im relativen Vergleich der Messparameter innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe den 100%- oder Ausgangswert.

In Versuchsgruppe 1 ergab sich am Versuchsende nach 110 Minuten eine Abnahme der auxotonen linksventrikulären Kontraktionsamplitude auf $53,1 \pm 5,5$ mmHg oder relativ auf $62 \pm 4,6$ % bezüglich des Ausgangswertes, ein Anstieg des Koronarwiderstandes auf $4,37 \pm 0,49$ mmHg x min x g x ml⁻¹ und ein Abfall der Herzfrequenz auf 140 ± 10 min⁻¹. Ein Kaninchenherz entwickelte in der 83. Minute, also 7 Minuten vor Ende des Versuches, ein Kammerflimmern. Alle anderen Herzen dieser Versuchsgruppe blieben funktionell

unauffällig. In den Versuchsgruppen 2 und 4 entwickelten jeweils 2 Kaninchenherzen Kammerflimmern. Auffällig ist die vorzeitige Abbruchrate durch Kammerflimmern von 4 Kaninchenherzen in Versuchsgruppe 3.

All diese Versuche schieden nach Entstehung des Kammerflimmerns aus der Auswertung der herzspezifischen Parameter aus.

	Amp [mmHg]	W_{Cor} [mmHgxminxgxml⁻¹]	hf [min⁻¹]	P_{Aorta} [mmHg]	Amp_{MW5-15} [mmHg]
VG1	80,3 ± 6,7	2,57 ± 0,13	185,8 ± 9,4	72,3 ± 1,2	92,4 ± 8,3
VG2	79,7 ± 13,5	2,65 ± 0,19	177,6 ± 12,8	72,2 ± 2,7	87,8 ± 12,9
VG3	61,3 ± 4,2	2,82 ± 0,14	174,5 ± 12,1	70,8 ± 1,7	62,9 ± 5,3
VG4	59,7 ± 6,1	2,75 ± 0,13	179,6 ± 10,6	68,2 ± 1,2	78,3 ± 6,2

Tab. 4.1-1 Herzspezifische Parameter zu Beginn der Versuche bzw. vor der Ischämie

In Tab. 4.1-2 sind die gemessenen Parameter der Versuchsgruppen 1 bis 4 am Ende des Versuches (90. Minute) aufgelistet:

	Amp [mmHg]	W_{Cor} [mmHgxminxgxml⁻¹]	hf [min⁻¹]
VG1	53,1 ± 5,5	4,37 ± 0,49	140 ± 10
VG2	39,1 ± 10,1	4,87 ± 0,87	163,3 ± 14,9
VG3	9,7 ± 2,2	7,36 ± 0,79	148,6 ± 24,4
VG4	19 ± 5,9	5,24 ± 0,77	156,5 ± 12,6

Tab. 4.1-2 Herzspezifische Parameter am Ende der Versuche (90. Minute)

4.1.1 Relative linksventrikuläre Kontraktionsamplitude

Ein Vergleich der Versuchsgruppen 2 bis 4 bezüglich der relativen linksventrikulären Kontraktionsamplitude (Abb. 4.1-1) in der Reperfusionsphase (30.-90.Minute) ergibt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen VG2 und VG3 ($p < 0,001$), sowie zwischen VG2 und VG4 ($p < 0,002$). Dabei sind die linksventrikulären Kontraktionsamplituden der beiden mit LPS stimulierten Versuchsgruppen in der Reperfusionsphase deutlich niedriger. Der Vergleich der Kontrollgruppe VG1 mit den Ischämiegruppen (VG2 bis 4) zeigt ebenfalls

hochsignifikant ($p < 0,001$) bessere Verläufe der relativen Kontraktionsamplituden zwischen der 30. und der 90. Minute in dieser Gruppe.

Durch Vernachlässigung des steilen postischämischen Druckanstieges direkt nach der Ischämie zeigt der Vergleich zwischen VG3 und der mit Calpain behandelten Gruppe VG4 ab der 32. Minute, dass die linksventrikuläre Druckamplitude der Calpaingruppe VG4 ein signifikant ($p < 0,03$) besseres Ergebnis erzielt hat. Die nachfolgende graphische Darstellung zeigt diese Ergebnisse im Überblick:

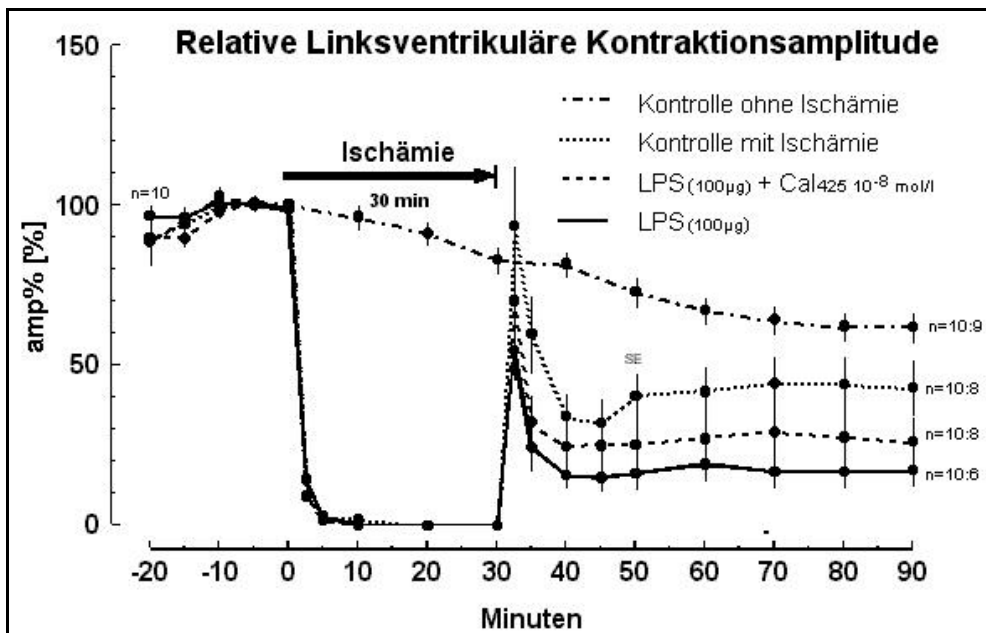


Abb. 4.1.1-1 Relative Änderung der linksventrikulären Kontraktionsamplitude über die Versuchszeit mit Standardfehler des Mittelwertes.

4.1.2 Koronarer Gesamtwiderstand

Ein Vergleich des koronaren Gesamtwiderstandes (W_{Cor}) der VG3 mit den anderen Gruppen zeigt, dass der Gesamtwiderstand in dieser, mit LPS stimulierten Gruppe, hochsignifikant ($p < 0,001$) erhöht ist. In der ebenfalls mit LPS stimulierten Calpaingruppe (VG4) ist der Gesamtwiderstand somit hochsignifikant niedriger.

Ausserdem unterscheidet sich W_{Cor} der VG1 von VG4 signifikant ($p < 0,02$); er ist in VG4 signifikant erhöht.

Alle anderen Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

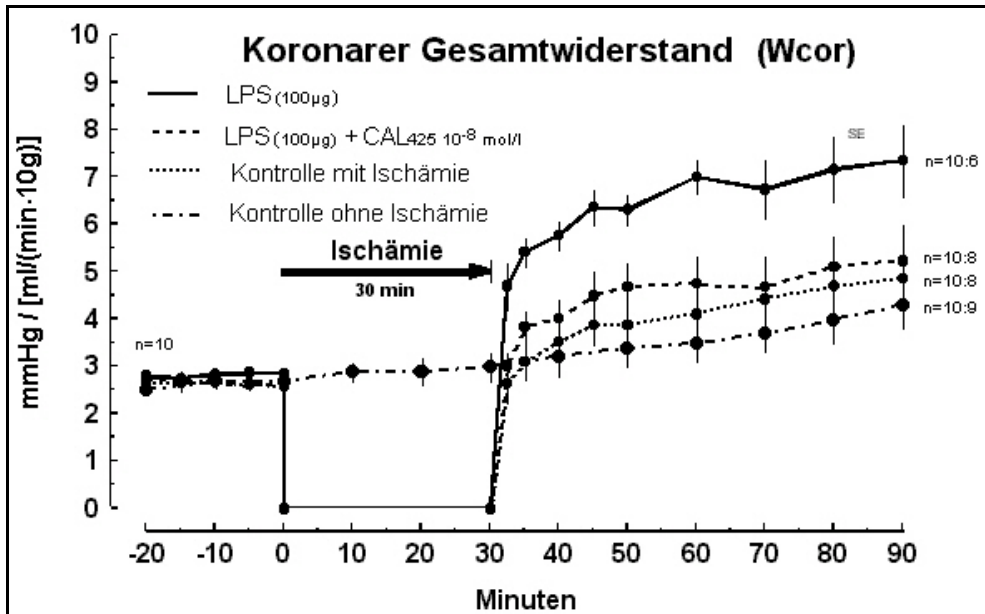


Abb. 4.1.2-1 Relative Änderung des koronaren Gesamtwiderstandes (W_{Cor}) über die Versuchszeit mit Standardfehler des Mittelwertes.

4.1.3 Herzfrequenz

Hier zeigt sich eine hochsignifikant ($p < 0,001$) höhere Herzfrequenz bei den Herzen der VG3 (Ischämiegruppe mit LPS-Stimulation) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Ischämie (VG1) in der Reperfusionsphase.

Alle anderen Vergleiche zeigen keine signifikanten Unterschiede.

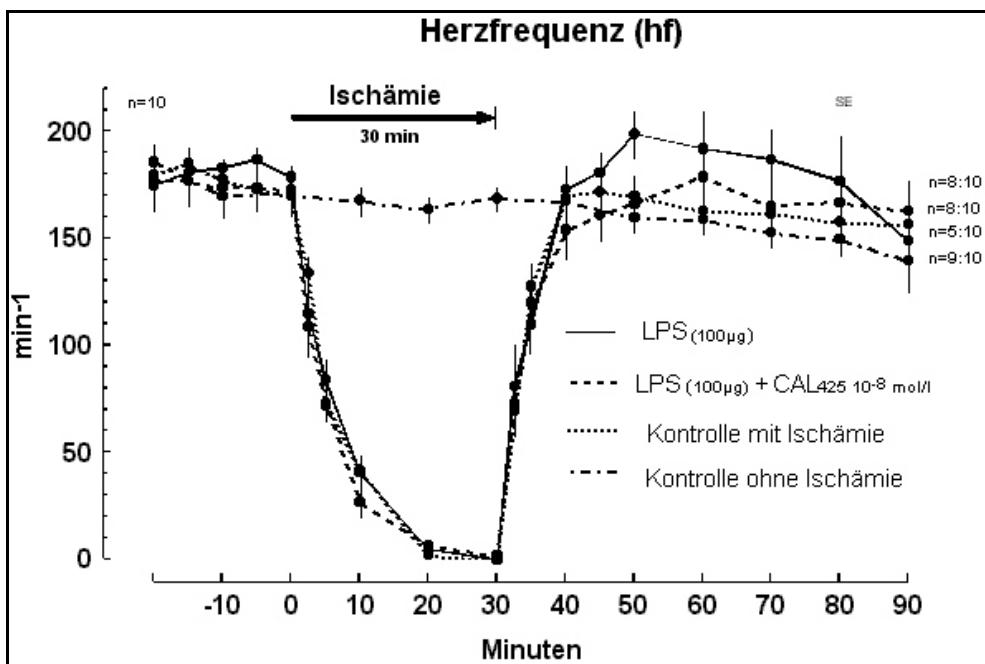


Abb. 4.1.3-1 Relative Änderung der Herzfrequenz über die Versuchszeit mit Standardfehler des Mittelwertes.

4.2 Auswertung der Ergebnisse des diskontinuierlichen Monitoring

Die aus dem postkardialen (venösen) System entnommenen und im Institut für Klinische Chemie analysierten Proben zur Beurteilung der Freisetzung der herzspezifischen Metabolite Kreatinphosphokinase (CK) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) zeigen folgende Ergebnisse:

4.2.1 Kreatinphosphokinase (CK)

Die gemessenen Konzentrationen bei den drei Ischämieversuchsgruppen VG2 bis VG4 zeigen zu Beginn der Versuche in der 1. Probe keinen statistisch signifikanten Unterschied untereinander.

Ein Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Ischämie (VG1) zeigt zu Beginn eine hochsignifikant niedrigere ($p < 0,01$) CK Konzentration in der Ausscheidung gegenüber den anderen Versuchsgruppen.

Ein Vergleich der Gruppen in der Reperfusionsphase zeigt ebenfalls eine hochsignifikant niedrigere CK Konzentration in der Kontrollgruppe ohne Ischämie (VG1) gegenüber VG2 ($p < 0,02$), VG3 ($p < 0,001$) und VG4 ($p < 0,001$). Im Vergleich der Ischämie-Kontrollgruppe (VG2) mit VG3 (Ischämie+LPS) und VG4 (Ischämie+LPS+Calpaininhibitor) zeigt sich eine ebenfalls hochsignifikant niedrigere CK Konzentration in den Sammelproben während der Reperfusionsphase (VG3: $p < 0,01$; VG4: $p < 0,05$).

Ein Vergleich der beiden LPS-Versuchsgruppen mit Ischämie und Calpaininhibitor (VG3 und VG4) zeigt keinen signifikanten Unterschied in der CK Freisetzung während der Reperfusionsphase.

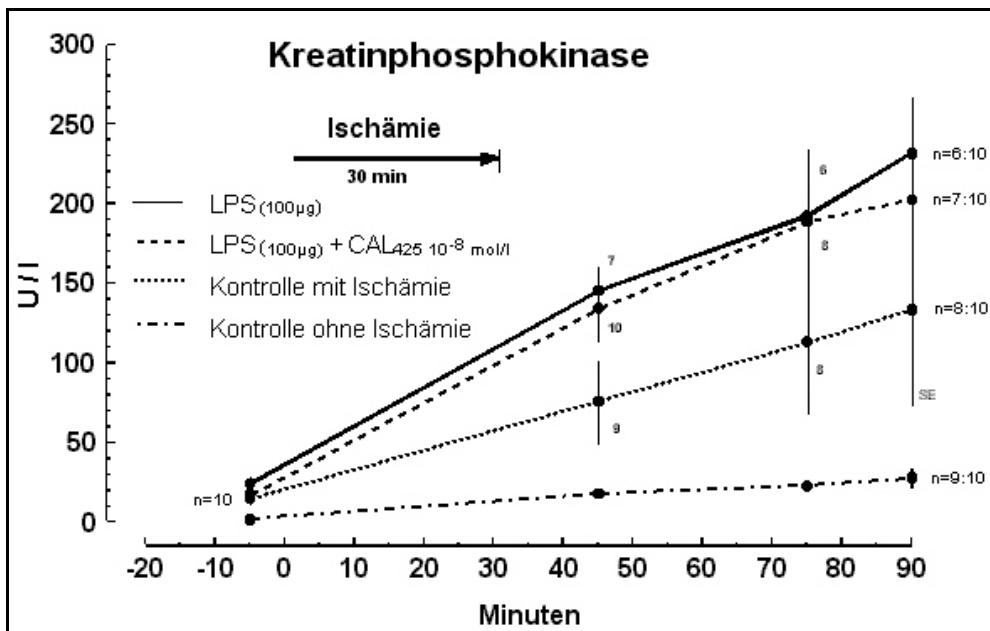


Abb. 4.2.1-1 Relative Änderung der Ausscheidung der Kreatinphosphokinase (CK) über die Versuchszeit mit Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.2 Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Im Vergleich der Kontrolle ohne Ischämie (VG1) mit den Versuchsgruppen mit Ischämie zeigt sich in der Reperfusionsphase kein Unterschied zur Kontrollgruppe mit Ischämie (VG2), aber hochsignifikant niedrigere LDH Konzentrationen zu VG3 ($p < 0,02$) und VG4 ($p < 0,05$). Ebenso sind die gemessenen LDH Konzentrationen der Kontrollgruppe mit Ischämie (VG2) hochsignifikant niedriger als die der VG3 ($p < 0,01$) und VG4 ($p < 0,03$).

Ein Vergleich der beiden LPS-Versuchsgruppen mit Ischämie und Calpaininhibitor (VG3 und VG4) zeigt keinen signifikanten Unterschied in der CK Freisetzung während der Reperfusionsphase.

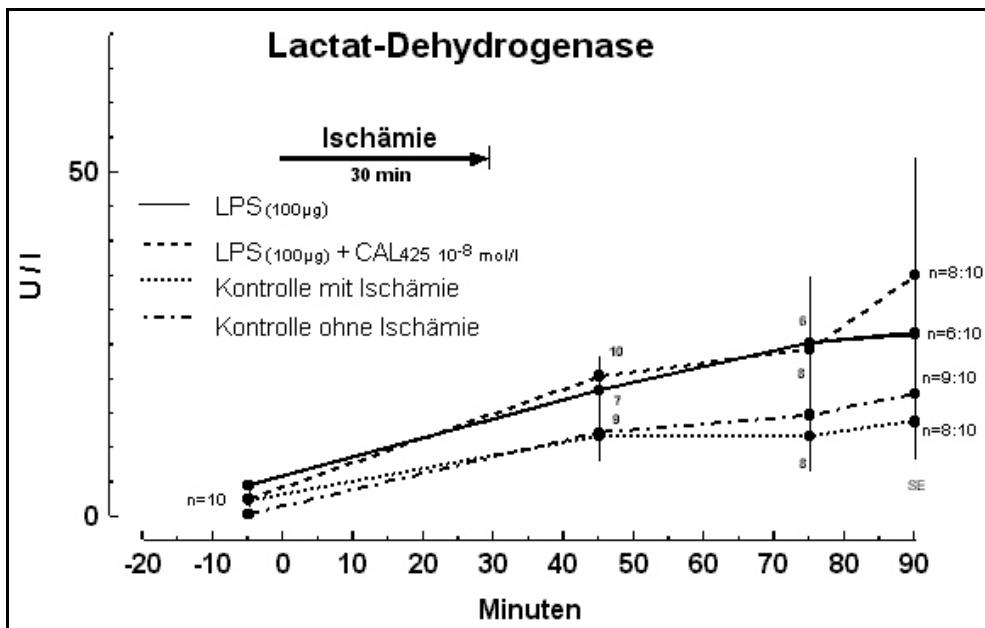


Abb. 4.2.1-1 Relative Änderung der Ausscheidung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) über die Versuchszeit mit Standardfehler des Mittelwertes.

5 Fragestellung

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll eine Methode zur Quantifizierung der Calpainaktivität am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens entwickelt werden. Diese Methode soll, unter Verwendung zellgängiger und calpainspezifischer Substrate, sowohl in einer in vitro Versuchsreihe, als auch in vivo am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens nach Langendorff getestet werden.

Als Calpainsubstrate stehen neben diverse Proteinen kurzkettige Peptide zur Verfügung, die C-terminal mit dem Fluorogen AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) als Label amidartig verknüpft sind. Durch Abspaltung des Aminosäurerestes kann die fluoreszierende Aktivität des Spaltproduktes 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) mittels fluoreszenzspektroskopischer Untersuchung bestimmt werden. Durch kontinuierliche Messung des fluoreszierenden Spaltproduktes kann auf die Spaltungsaktivität des Calpains oder anderer beteiligter Proteasen rückgeschlossen werden. Eine Differenzierung anderer, an der Spaltung der calpainspezifischen Substrate beteiligten Proteasen, erfolgte in verschiedenen in vitro Versuchsreihen mit Hilfe verschiedener Proteinase- bzw. Calpaininhibitoren sowie eines Proteasominhibitors. In den Versuchen am Langendorff Modell wurde der Calpain-Inhibitor-I (N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal, Fa. Roche) verwendet.

Mit Hilfe dieser Inhibitoren soll eine selektive Hemmung des aktivierten Calpains mit Calpain-Inhibitor-I durch verminderte Spaltung des angebotenen fluorogenen Substrates in vitro und in vivo nachgewiesen werden.

6 Material und Methoden

6.1 Fluoreszenzspektroskopie

Als Fluoreszenz wird die ungerichtete Emission von Licht bezeichnet, die im Unterschied zur Phosphoreszenz nur so lange auftritt, wie die fluoreszierenden Moleküle durch Lichtabsorption elektronisch angeregt werden. Diese fluoreszierenden Moleküle werden auch als Fluorophore bezeichnet. Das Phänomen der Fluoreszenz besteht darin, dass eine Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge, Excitation) angeregt wird und bei der Rückkehr der Moleküle in den Grundzustand Licht in einer grösseren Wellenlänge (Emissionswellenlänge, Emission) emittiert wird. Dabei wird bei der in dieser Arbeit verwendeten stationären Fluoreszenzspektroskopie mittels eines Fluoreszenzspektrometers wellenlängenabhängig das gesamte Fluoreszenzspektrum dieses emittierten Lichtes unter Verwendung einer kontinuierlichen Anregungslichtquelle gemessen.

Die Intensität der Fluoreszenz steht in verdünnten Lösungen im linearen Zusammenhang mit der Konzentration des Fluorophors, der neben stoffspezifischen Grössen auch von gerätespezifischen Grössen abhängt. Daher wird die Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) angegeben. Die Darstellung der RFI in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge bei gegebener, fester Anregungswellenlänge wird als Fluoreszenz-Emissionsspektrum bezeichnet. Die Auftragung der RFI bei einer konstanten Emissionswellenlänge gegen die jeweilige Anregungswellenlänge führt zum Fluoreszenz-Exzitationsspektrum. Da sich diese Spektren in Form einer Kurve darstellen lassen, werden sie auch als eindimensionale Verfahren bezeichnet. In diesen Spektren äussert sich die Fluoreszenz als Peak. Der Punkt dieses Peaks mit der höchsten RFI wird als Fluoreszenzmaximum bezeichnet.

Bei einer Fluoreszenzmessung werden im Idealfall nur Fluorophore erfasst, ohne dass andere Moleküle das Ergebnis beeinflussen. Diese Spezifität wird noch dadurch vergrössert, dass Substrate und Fluorophore sich durch unterschiedliche Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen unterscheiden. Dennoch sind in der Literatur vielfältige Einflussgrössen und Störfaktoren beschrieben, die zu Wechselwirkungen der Fluorophore mit ihrer Umgebung führen können und Fluoreszenzmessungen beeinflussen.

Bei höherer Temperatur kommt es zur Abnahme der Fluoreszenzintensität, da die Wahrscheinlichkeit von desaktivierenden Stößen mit anderen Molekülen wächst. Eine Protonierung biogener Fluorophore verändert häufig deren Fluoreszenzeigenschaften (Intensität, Lage des Fluoreszenzpeaks), was den Einfluss des pH-Wertes erklärt. Auch Veränderungen von Dichte, Polarität und Viskosität des Mediums wirken sich aus. Durch Messungen unter in vivo Bedingungen und das damit verbundene Vorhandensein von Zellen und Zelldetritus vergrößert sich die Trübung und das Streulicht nimmt zu. Damit wird die Eindringtiefe des Anregungslichtes und auch die mittlere freie Weglänge des Emissionslichtes verringert. Fluoreszenzlöschung kann durch neutrale Moleküle (z.B. Sauerstoff), Anionen (z.B. Iodide, Bromide, Nitrate) oder Kationen (z.B. Cr^{3+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}), aber auch durch Zellmembranen erfolgen. Vor allem gefärbte Medien liefern ein nach aussen sichtbares Zeichen für Fluoreszenzlöschung durch vermehrte Absorption. Konzentrations-Fluoreszenzlöschung (concentration quenching) zeigt sich als Abnahme der RFI, wenn die Konzentration des Fluorophors oberhalb des Sättigungsbereiches liegt. Hierbei wirkt sich der *Inner-filter*-Effekt aus, denn bei hoher Fluorophorkonzentration wird das Anregungslicht so stark absorbiert, dass es von den Fluorophoren herausgefiltert und an einem tieferen Eindringen gehindert wird. Der *Inner-filter*-Effekt wirken sich besonders bei Küvettenmessungen aus.

Als Kaskadeneffekt wird die Reabsorption emittierter Fluoreszenzstrahlung zur Anregung weiterer Fluorophore verstanden, die eine geringere Konzentration des zuerst angeregten Stoffes vortäuscht. Fluoreszenzsignale können sich dadurch überlagern, und Fluoreszenzmaxima können verschoben werden. Als Fluoreszenz-Photobleaching wird die Veränderung oder gar Zerstörung von Fluorophoren durch energiereiches Anregungslicht bezeichnet.

Daher ist es von entscheidender Bedeutung, die Umgebungsbedingungen während der verschiedenen Messungen möglichst konstant zu halten.⁵⁵⁻⁵⁷

6.2 Verwendete Substanzen und Geräte

6.2.1 Fluoreszenzspektrometer

Bei dem verwendeten Fluoreszenzspektrometer handelt es sich um das F-4500 der Firma Hitachi, Japan. Die Wellenlängen von Excitation und Emission können unabhängig voneinander mit Hilfe eines Gittermonochromators mit wählbarer Spaltbreite (in allen Versuchen 2,5mm) eingestellt werden. Ein Stahlteiler lenkt einen Teil des Anregungslichtes auf einen Referenzphotomultiplier, wodurch Intensitätsschwankungen an der Lichtquelle kompensiert werden. Ein Verschluss (shutter) sorgt dafür, dass die Probe nicht ständig angeregt wird (spezielle Charakteristika: <http://www.hii.hitachi.com/f4500.htm>).

Die Gerätesteuerung und die Datenaufnahme erfolgen über einen Personal-Computer (Betriebssystem: Windows 3.1) mittels der gerätespezifischen Software „fl4500“. Die ermittelten Daten wurden in ASCII-Dateien zur weiteren statistischen und graphischen Verarbeitung umgewandelt (siehe 6.4).

6.2.2 Substrate und Fluorophor

In dieser Arbeit wurden die calpainspezifischen, zellpermeablen, fluorogenen Substrate SLLVY-AMC (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amino-4-Methylcoumarin) und SLY-AMC (Suc-Leu-Tyr-7-Amino-4-Methylcoumarin) verwendet. Diese Substrate haben eine zu vernachlässigende Autofluoreszenz und können zu Versuchszwecken in Zellhomogenaten, Lösungen und intakten Zellverbänden verwendet werden. Nach hydrolytischer Abspaltung des Aminosäurenrestes kann die fluoreszierende Aktivität des Spaltproduktes 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) mittels fluoreszenzspektroskopischer Untersuchung bestimmt werden. Das Spaltprodukt AMC wird laut Hersteller Molecular Probes (Leiden, Niederlande) schlecht in vitalen Zellen zurückgehalten, so dass sich fluoreszenzspektroskopische Messungen am Lebendmodell anbieten.

Beide Substrate, sowie das zur Erstellung der Eichkurve benötigte AMC, stammen von der Firma Bachem Feinchemikalien AG (CH-4416 Bubendorf, Schweiz). Folgende Fluoreszenzeigenschaften werden von der Firma Molecular Probes Europe (Leiden, Niederlande, <http://www.probes.com>) für AMC und Substrate angegeben:

	Substrate	AMC
Excitationsmaximum	324 nm	342 nm
Emissionsmaximum	390 nm	441 nm

Nach eigenen fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen mit dem Fluoreszenzspektrometer F-4500 der Firma Hitachi, ergibt sich bei einer Anregungswellenlänge von 342 nm für das Fluorophor AMC (Abb. 6.2.2-1) ein Fluoreszenzmaximum bei 442 nm.

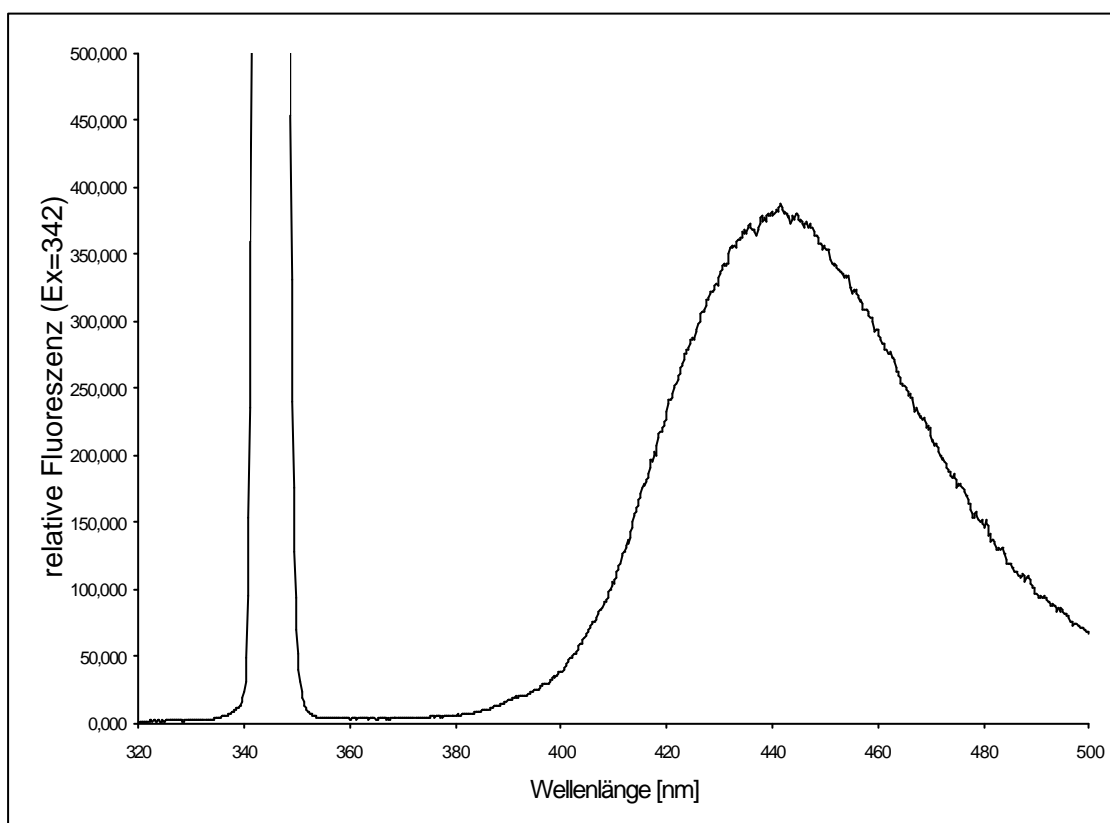


Abb. 6.2.2-1 Darstellung des Emissionsmaximums von 300pMol AMC(Ex=342 nm)

In den folgenden fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wird das Fluoreszenzemissionsmaximum von AMC auf 442 nm festgelegt. Die Anregungswellenlänge wird auf 360 nm festgelegt, um eine minimale störende Überlagerung der sehr schwach fluoreszierenden Substrate weitgehend zu vermeiden.

6.2.3 Calpain-Inhibitoren

Der in diesem zweiten Teil der Arbeit in vitro und in vivo verwendete Calpain-Inhibitor N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal (auch: Calpain-Inhibitor-I; Mw=383,5 kDa) der Fa. Roche ist ein starker, kompetitiver Inhibitor der Ca^{2+} -abhängigen Proteasen Calpain I und II mit einem K_i -Wert zwischen 120 nM und 230 nM. Calpain-Inhibitor-I hemmt ausserdem Papain, sowie Cathepsin B und L.

N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal ist auf Grund seines geringen Molekulargewichtes und seiner Lipophilie membranpermeabel (Quelle: Firma Roche).

Ausserdem wurden in den in vitro Versuchen die beiden Calpain Inhibitoren CAL425 (siehe Abschnitt 3.5.2) und CAL961 der Firma BASF AG (Ludwigshafen) verwendet. Beides sind synthetische, wasserlösliche Proteaseninhibitoren mit guter Gewebepenetration. Folgende Bindekonstanten und Molekulargewichte werden von der BASF AG angegeben:

	CAL425	CAL961
Molekulargewicht	421,5 kDa	579,7 kDa
Calpain I	13 nM	18 nM
Cathepsin B	27 nM	83 nM
Cathepsin L	22 nM	151 nM

Tab. 6.2.3-1 Molekulargewichte und K_i -Werte von CAL425 und CAL961

Beide Inhibitoren sind daher starke Inhibitoren von Calpain I, Cathepsin B und Cathepsin L.

6.2.4 Proteasom-Inhibitor

Proteasom, ein ubiquitäres, intrazelluläres, nicht lysosomales Multikomplexenzym, ist involviert in zahlreiche intrazelluläre Prozesse. Dazu zählt besonders der Abbau von Proteinen im Rahmen des intrazellulären Proteinmetabolismus⁵⁸. Daran sind im wesentlichen drei peptidspaltende Zentren des Proteasoms beteiligt. Es handelt sich dabei um chymotrypsin-, trypsin- und caspaseähnliche Zentren, deren Hemmung mit dem Inhibitor Lactacystin durchgeführt werden kann. Dabei erfolgt diese Hemmung jedoch nicht durch das Lactacystin, sondern durch clasto-Lactacystin β -Lactone, der lactonisierten Form des Lactacystins, das nach spontaner intramolekularer Konformationsänderung, der Laktonisierung, entsteht^{58; 59}. Clasto-Lactacystin β -Lactone hemmt die aktiven Zentren des Proteasoms 15-20 mal schneller als Lactacystin

und ist ausserdem, im Gegensatz zu Lactacystin, zellgängig^{58; 59}. Nach Fenteany et al. ist clasto-Lactacystin β -Lactone hochspezifisch zur Hemmung des Proteasom und hat weder inhibitorische Effekte auf Serinproteasen wie Thrombin, Plasminogen, Trypsin oder Chymotrypsin, noch auf Cysteinproteasen wie Papain, Cathepsin B, Calpain I und II⁵⁹. Da das Proteasom auch an der Spaltung fluorogener Substrate beteiligt ist, ist die Hemmung mit clasto-Lactacystin β -Lactone in den durchgeführten in vitro Versuchen sinnvoll.

Aus finanziellen Gründen musste auf eine Anwendung des clasto-Lactacystin β -Lactone in den in vivo Versuchsreihen verzichtet werden.

Das in den Versuchen verwendete clasto-Lactacystin β -Lactone stammt von der Firma Calbiochem, hat ein Molekulargewicht von 213,2 kDa und wurde in DMSO gelöst. Die halbmaximale Hemmdosis (ID_{50}) wird mit $1\mu M$ angegeben (Quelle: Fa. Calbiochem).

6.2.5 Proteinasen-Inhibitoren

Zur Differenzierung der an der Spaltung der calpainspezifischen Substrate beteiligten Proteasen wurden in den in vitro Versuchen ausser den Calpaininhibitoren und dem Proteasominhibitor die in Tabellen 6.2.4-1 und 6.2.4-2 aufgeführten Proteinaseinhibitoren verwendet. Es sollte der Einfluss anderer Proteasen wie Cystein-, Serin-, Metallo- oder Aspartatproteasen auf die Substratspaltung beurteilt werden.

Inhibitor	Molekulargewicht	Inhibition	Bezugsquelle
Phenylmethylsulfonylfluorid (<i>PMSF</i>)	174,2 kDa	Serinproteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Acetylcholinesterase)	Sigma
Isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta (<i>Pepstatin A</i>)	685,9 kDa	Aspartatproteasen (Pepsin, Renin, Cathepsin D)	Sigma

Tab. 6.2.4-1 Verwendete Proteinaseinhibitoren

Desweiteren wurden folgende Proteinasen-Inhibitor-Cocktails verwendet, um eine möglichst breite Inhibition anderer Proteasen zu erreichen.

Inhibitor	Zusammen- setzung	Inhibition	Bezugs- quelle
Proteasen- Inhibitor- Cocktail (P2714)	Bestatin, Leupeptin, Aprotinin, E-64, AEBSF	Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen	Sigma
Proteasen- Inhibitor- Cocktail (Complete)	Keine Angabe	Trypsin, Chymo- trypsin, Thermolysin, Papain, Pronase, Pankreasextrakt	Boehringer Mannheim

Tab. 6.2.4-2 Verwendete Proteasen-Inhibitor-Cocktails

6.2.6 Calpain und Calpain-Messpuffer

Das verwendete μ -Calpain wurde von Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München) aus humanen Erythrozyten isoliert und uns freundlicherweise für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt [D.Gabrijelcic-Geiger et al.: Biol.Chem.Hoppe-Seyler, 2001 (in press)].

Der ebenfalls verwendete Messpuffer I besteht aus 500 μ l Brij-35-Solution (Fa. Sigma-Aldrich, 89552 Steinheim) auf 999,5 ml Trispuffer (0,05M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH=7,5, Fa. Sigma-Aldrich, 89552 Steinheim).

Der Messpuffer II besteht aus 10^{-2} M DL-Dithiothreitol (Fa. Sigma-Aldrich, 89552 Steinheim) und $1,5 \times 10^{-3}$ M CaCl_2 (Fa. Sigma-Aldrich, 89552 Steinheim).

6.3 Versuchsdurchführung

6.3.1 Standardeichkurven

Zur Umrechnung der fluoreszenzspektrometrisch ermittelten relativen Fluoreszenzintensitäten in absolute molare Konzentrationen des fluoreszierenden Spaltproduktes AMC wurden Standardeichkurven erstellt. Die Emissionsspektren verschiedener Ansätze mit bekannten AMC-Konzentrationen in pMol wurden mit einer Exzitation von 360nm ermittelt (Abbildung 6.3.1-1).

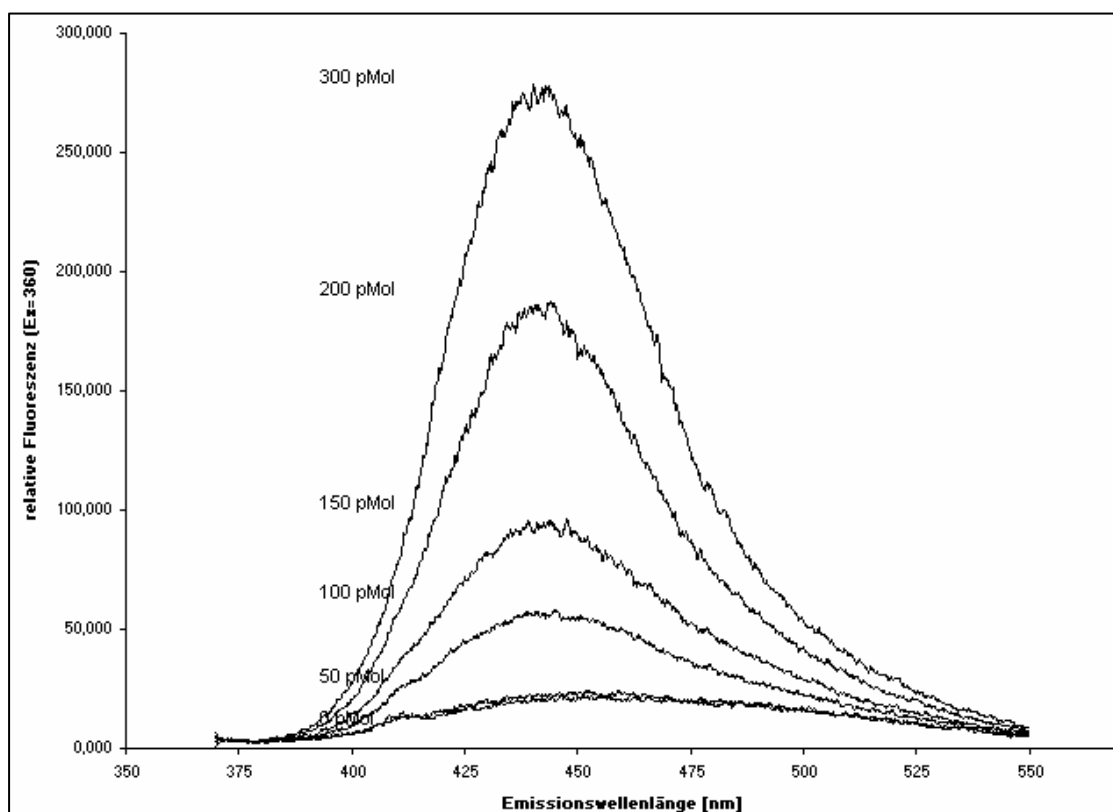


Abb. 6.3.1-1 Emissionsspektren der Standardeichkurven

Mit den erhaltenen Fluoreszenzmaxima bei einem Fluoreszenzemissionsmaximum des AMC bei 442 nm wird eine lineare Eichgerade (Abbildung 6.3.1-2) erstellt. Die Berechnung der molaren AMC-Konzentration in pMol erfolgt gemäss der umgeformten Funktionsgleichung:

$$X \text{ [AMC in pMol]} = (y \text{ [RFI]} - 14,171) / 0,8552$$

Für eine Fluoreszenzsteigerung um 100 RFI werden demnach 116,93 pMol AMC benötigt.

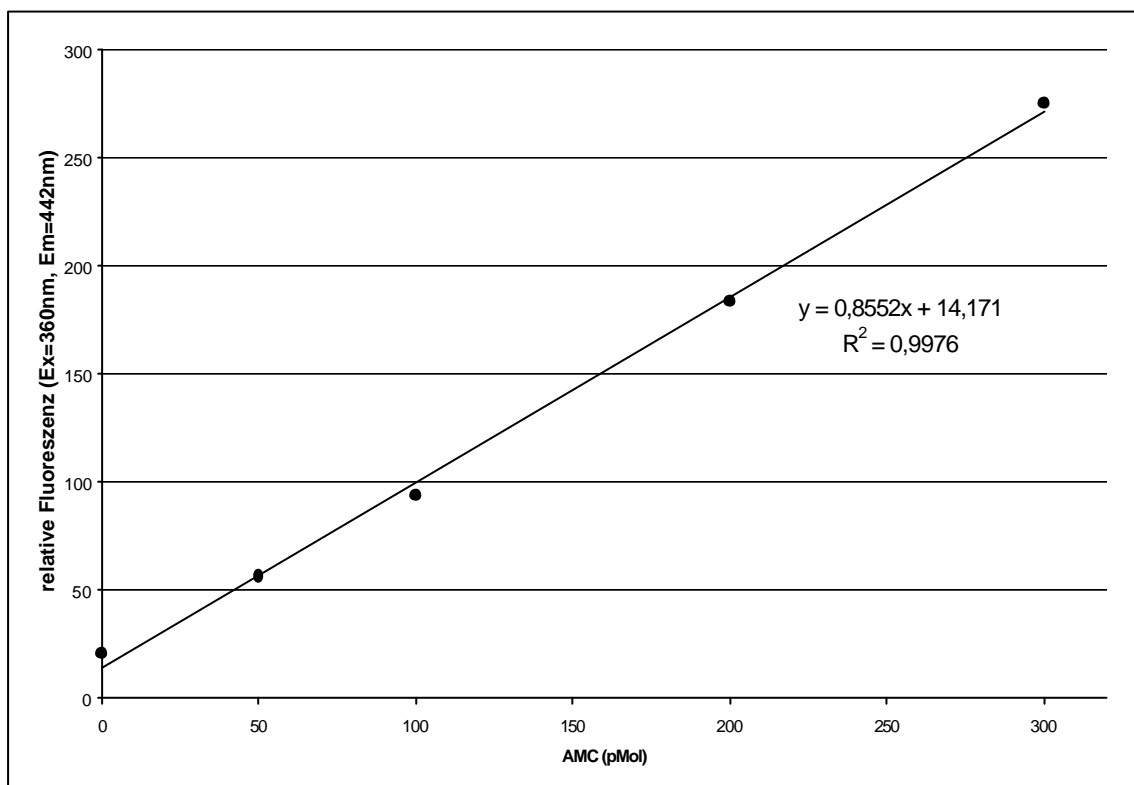


Abb. 6.3.1-2 Lineare Funktionsgerade zur Umrechnung der RFI in pMol AMC

6.3.2 In vitro Versuche

Ziele der in vitro Versuche waren zum einen die Erprobung des fluoreszenzspektroskopischen Verfahrens unter Verwendung von Herzmuskel- und Lungengewebe vom Kaninchen, sowie die Aufdeckung möglicher Einfluss- oder Störgrössen. Dazu zählte unter anderem die Testung der spontanen Substratspaltung durch Licht, der Einfluss von Temperaturschwankungen zwischen +4°C und +40°C, die Applikation 100%-igen Sauerstoffs und die Verwendung

von Lösungsmittel wie Ethanol oder DMSO. Alle diese Tests zeigten keinen signifikanten Anstieg des Spaltproduktes, so dass von keiner Beeinflussung der Versuchsreihen durch diese Faktoren ausgegangen werden kann. Desweiteren erwies sich die Verwendung von Gewebehomogenat im Versuch als beste Methode zur in vitro Testung der verschiedenen Substanzen, da die in die Versuchsröhrchen hinzugegebene Gewebemenge präziser abgemessen werden konnte als bei Verwendung von intakten Gewebeteilen.

Zur Optimierung der Methode wurden zwei unterschiedliche calpainspezifische Substrate, sowie deren optimale Konzentrationen geprüft. In diesem Zusammenhang spielte auch die Spaltung des Substrates durch andere Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen und andere Enzyme eine wichtige Rolle. Der Einfluss dieser Proteasen wurde durch Zugabe bestimmter Proteaseninhibitoren bzw. Proteaseninhibitorencocktails (siehe 6.2.5) untersucht. Desweiteren wurde ein Proteasominhibitor (siehe 6.2.4) hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Substratspaltung getestet. Als Calpaininhibitoren wurden CAL425, CAL961 und Calpain-Inhibitor-I bezüglich ihrer Hemmung der calpainspezifischen Substrate getestet (siehe 6.2.3).

Es wurden 6 in vitro Versuche (V1, V2, usw.) durchgeführt.

Jedem Versuchsansatz, der jeweils zur Kontrolle doppelt angesetzt wurde, wird eine Versuchsnummer (z.B. V1-1, V1-2, usw.) zugewiesen.

6.3.2.1 Gewinnung von Gewebehomogenat

Zu den in vitro Versuchen wurde Gewebehomogenat vom Kaninchenherzen, sowie Gewebehomogenat von der Kaninchenlunge, hergestellt.

Nach Organentnahme gemäss der in Kapitel 3.2 beschriebenen Präparation wurde das Gewebe sorgfältig von umgebenem Fett- und Bindegewebe gesäubert. Anschliessend wird dem Myokardgewebe des linken Ventrikels, bzw. dem Lungengewebe beider Lungen, im Verhältnis 1:4 NaCl hinzugegeben und die erhaltenen Gewebesuspensionen anschliessend homogenisiert. Das Homogenat wurde dann durch Pipettieren den jeweiligen Versuchsansätzen hinzugegeben.

6.3.2.2 Wirkung verschiedener Proteaseninhibitoren auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskelhomogenat

In dieser Versuchsgruppe (V1) werden Ansätze mit SLLVY-AMC als Substrat nach Zugabe von Herzmuskelhomogenat und verschiedener Proteaseninhibitoren fluorezenzspektrometrisch untersucht. Die Pipettierung der Ansätze erfolgte in folgender Reihenfolge:

1. Inhibitor
2. Herzmuskelhomogenat (HH)
3. SLLVY-AMC (2×10^{-6} M) in DMSO und KHPuffer

Die Ansätze wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 6.3.2.2-1 pipettiert und anschliessend eine Stunde bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte die fluorezenzspektrometrische Untersuchung.

V	Inhibitor	SLLVY-AMC	HH
1-1	0,7 ml NaCl	1,3 ml	
1-2	0,2 ml NaCl	1,3 ml	0,5ml
1-3	0,2 ml Roche (10^{-3} M)	1,3 ml	0,5ml
1-4	0,2 ml Roche (10^{-4} M)	1,3 ml	0,5ml
1-5	0,2 ml CAL425 (10^{-3} M)	1,3 ml	0,5ml
1-6	0,2 ml CAL425 (10^{-5} M)	1,3 ml	0,5ml
1-7	0,2 ml CAL425 (10^{-7} M)	1,3 ml	0,5ml
1-8	0,2 ml Complete	1,3 ml	0,5ml
1-9	0,2 ml PMSF	1,3 ml	0,5ml
1-10	0,2 ml P2714	1,3 ml	0,5ml
1-11	0,2 ml Pepstatin A (10^{-3} M)	1,3 ml	0,5ml

Tab. 6.3.2.2-1 Pipettierschema zu Versuchsgruppe V1; HH=Herzmuskelhomogenat

Als Kontrolle (Leerwert) für eine basale Spaltung des Substrates diene ein Testansatz ohne Herzmuskelhomogenat und ohne Inhibitor (V1-1) und als Kontrolle für 100% Spaltung des Substrates diene ein Testansatz mit Herzmuskelhomogenat und ohne Inhibitor (V1-2).

V1-3 bis V1-7 dienten der Findung des potenteren Calpain-Inhibitors, sowie der optimalen Konzentration des jeweiligen Inhibitors, in bezug auf die Durchführung späterer in vivo Versuche. V1-8 bis V1-11 dienten der Untersuchung

des Einflusses anderer Proteasen, wie Serin-, Cystein-, Metallo- oder Aspartatproteasen unter Verwendung spezifischer Proteinaseinhibitoren bzw. Proteinaseinhibitorcocktails.

6.3.2.3 Wirkung verschiedener Proteaseninhibitoren auf die Spaltung von SLY-AMC durch Herzmuskelhomogenat

In dieser Versuchsgruppe (V2) werden Ansätze mit SLY-AMC als Substrat nach Zugabe von Herzmuskelhomogenat und verschiedener Proteaseninhibitoren fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Die Pipettierung der Ansätze erfolgte in folgender Reihenfolge:

1. Inhibitor
2. Herzmuskelhomogenat (HH)
3. SLY-AMC (5×10^{-6} M) in DMSO und KH-Puffer

Die Ansätze wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 6.3.2.3-1 pipettiert und anschliessend eine Stunde bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte die fluoreszenzspektrometrische Untersuchung.

Diese Versuchsgruppe diente zum Nachweis der Spaltung von SLY-AMC durch Herzmuskelhomogenat im Vergleich zur Spaltung von SLY-AMC mit SLLVY-AMC in V1.

Als Kontrolle (Leerwert) für eine basale Spaltung des Substrates diente ein Testansatz ohne Herzmuskelhomogenat und ohne Inhibitor (V2-1) und als Kontrolle für 100% Spaltung des Substrates diente ein Testansatz mit Herzmuskelhomogenat und ohne Inhibitor (V2-2).

V2-3 bis V2-8 dienten der Findung des potenteren Calpain-Inhibitors, sowie der optimalen Konzentration des jeweiligen Inhibitors, in bezug auf die Durchführung späterer in vivo Versuche. V2-9 bis V2-12 dienten der Untersuchung des Einflusses anderer Proteasen, wie Serin-, Cystein-, Metallo- oder Aspartatproteasen, unter Verwendung spezifischer Proteinaseinhibitoren bzw. Proteinaseinhibitorcocktails.

V	Inhibitor	SLY-AMC	HH
2-1	0,5 ml NaCl	1,5 ml	
2-2	0,2 ml NaCl	1,5 ml	0,3 ml
2-3	0,2 ml Roche (10^{-3} M)	1,5 ml	0,3 ml
2-4	0,2 ml Roche (10^{-5} M)	1,5 ml	0,3 ml
2-5	0,2 ml Roche (10^{-7} M)	1,5 ml	0,3 ml
2-6	0,2 ml CAL425 (10^{-3} M)	1,5 ml	0,3 ml
2-7	0,2 ml CAL425 (10^{-5} M)	1,5 ml	0,3 ml
2-8	0,2 ml CAL425 (10^{-7} M)	1,5 ml	0,3 ml
2-9	0,2 ml Complete	1,5 ml	0,3 ml
2-10	0,2 ml PMSF	1,5 ml	0,3 ml
2-11	0,2 ml Pepstatin A (10^{-3} M)	1,5 ml	0,3 ml
2-12	0,2 ml P2714	1,5 ml	0,3 ml

Tab. 6.3.2.3-1 Pipettierschema zu Versuchsgruppe V2; HH=Herzmuskelhomogenat

6.3.2.4 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskel- und Lungenhomogenat

In dieser Versuchsgruppe (V3) werden Ansätze mit SLLVY-AMC als Substrat nach Zugabe von Herzmuskel- bzw. Lungenhomogenat, sowie des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone, fluoreszenzspektrometrisch untersucht.

Die Pipettierung erfolgt in folgender Reihenfolge:

1. Proteasominhibitor
2. NaCl
3. Herzmuskelhomogenat (HH) oder Lungenhomogenat (LH)
4. SLLVY-AMC (4×10^{-6} M) in DMSO und KHPuffer

Die Ansätze wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 6.3.2.4-1 pipettiert und anschliessend eine Stunde bei 25°C inkubiert. Danach folgt die fluoreszenzspektrometrische Untersuchung.

Diese Versuchsgruppe sollte den Einfluss des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskel bzw. Lungenhomogenat untersuchen.

Ausserdem sollte die Substratspaltung durch Herzhomogenat mit der Spaltung durch Gewebehomogenat der Lunge verglichen werden.

Als Kontrolle (Leerwert) für eine basale Spaltung des Substrates diene ein Testansatz ohne Herzmuskelhomogenat bzw. Lungenhomogenat und ohne Inhibitor (V3-1 bzw. V3-6) und als Kontrolle für 100% Spaltung des Substrates diene ein Testansatz mit Herzmuskelhomogenat bzw. Lungenhomogenat und ohne Inhibitor (V3-2 bzw. V3-7).

V	NaCl	Proteasominhibitor	SLLVY-AMC	HH/LH
3-1	1,1 ml		0,9 ml	
3-2	0,7 ml		0,9 ml	0,4 ml HH
3-3	0,3 ml	0,4 ml ($2,5 \times 10^{-5}$ M)	0,9 ml	0,4 ml HH
3-4	0,5 ml	0,2 ml ($2,5 \times 10^{-5}$ M)	0,9 ml	0,4 ml HH
3-5	0,6 ml	0,1 ml ($2,5 \times 10^{-5}$ M)	0,9 ml	0,4 ml HH
3-6	1,1 ml		0,9 ml	
3-7	0,7 ml		0,9 ml	0,4 ml LH
3-8	0,3 ml	0,4 ml ($2,5 \times 10^{-5}$ M)	0,9 ml	0,4 ml LH
3-9	0,5 ml	0,2 ml ($2,5 \times 10^{-5}$ M)	0,9 ml	0,4 ml LH
3-10	0,6 ml	0,1 ml ($2,5 \times 10^{-5}$ M)	0,9 ml	0,4 ml LH

Tab. 6.3.2.4-1 Pipettierschema zu Versuchsgruppe V3; HH = Herzmuskelhomogenat; LH=Lungenhomogenat; Proteasominhibitor= clasto-Lactacystin β -Lactone

6.3.2.5 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskelhomogenat

In dieser Versuchsgruppe (V4) wurden Ansätze mit SLLVY-AMC als Substrat nach Zugabe von Herzmuskelhomogenat in Kombination verschiedener Proteaseninhibitoren mit dem Proteasominhibitor clasto-Lactacystin β -Lactone fluorezenzspektrometrisch untersucht. Die Pipettierung der Ansätze erfolgte in folgender Reihenfolge:

1. Herzmuskelhomogenat (HH)
2. Proteasominhibitor (10^{-4} M)
3. Calpain-Inhibitor
4. $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8×10^{-3} M)
5. NaCl
6. SLLVY-AMC (16×10^{-6} M) in DMSO und KH-Puffer

Die Ansätze wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 6.3.2.5-1 pipettiert und anschliessend eine Stunde bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte die fluorezenzspektrometrische Untersuchung.

Diese Versuchsgruppe sollte den Einfluss des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone in Kombination mit drei Calpain-Inhibitoren in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskelhomogenat untersuchen.

Als Kontrolle (Leerwert) für eine basale Spaltung des Substrates diene ein Testansatz ohne Herzmuskelhomogenat und ohne Inhibitor (V4-1) und als Kontrolle für 100% Spaltung des Substrates diene ein Testansatz mit Herzmuskelhomogenat und ohne Inhibitor (V4-2).

V4-3 ist ebenfalls ein Kontrollansatz mit Herzmuskelhomogenat und ohne Inhibitor, jedoch mit einer 2-fach höheren Endkonzentration an Substrat (SLLVY-AMC). Dieser Ansatz sollte zeigen, ob eine erhöhte Substratkonzentration eine wesentlich verstärkte Substratspaltung bewirkt.

In V4-4 bis V4-6 wurden unterschiedliche Proteasominhibitorkonzentrationen getestet.

V	NaCl	CaCl ₂	clasto- Lactacystin b - Lactone	Calpain- Inhibitor	SLLVY- AMC	HH
4-1	1,5 ml				0,5 ml	
4-2	0,9 ml	0,2 ml			0,5 ml	0,4 ml
4-3	0,4 ml	0,2 ml			1,0 ml	0,4 ml
4-4	0,4 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)		0,5 ml	0,4 ml
4-5	0,7 ml	0,2 ml	0,2 ml (10^{-4} M)		0,5 ml	0,4 ml
4-6	0,8 ml	0,2 ml	0,1 ml (10^{-4} M)		0,5 ml	0,4 ml
4-7	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml Roche (10^{-3} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-8	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml Roche (10^{-5} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-9	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml Roche (10^{-7} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-10	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml CAL425 (10^{-3} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-11	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml CAL425 (10^{-5} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-12	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml CAL425 (10^{-7} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-13	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml CAL961 (10^{-3} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-14	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml CAL961 (10^{-5} M)	0,5 ml	0,4 ml
4-15	0,2 ml	0,2 ml	0,5 ml (10^{-4} M)	0,2 ml CAL961 (10^{-7} M)	0,5 ml	0,4 ml

Tab. 6.3.2.5-1 Pipettierschema zu Versuchsgruppe V4; HH=Herzmuskelhomogenat

6.3.2.6 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Calpain I

In dieser Versuchsgruppe (V5) wurden Ansätze mit Calpain I (s. 6.2.6) nach Zugabe des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone, verschiedener Calpain-Inhibitoren und CaCl_2 zur Aktivierung des Calpains 60 Minuten bei 12°C inkubiert. Danach wurde das Substrat SLLVY-AMC zu den Ansätzen hinzupipettiert und die Ansätze wieder 60 Minuten bei 12°C inkubiert. Anschliessend erfolgte das Beenden der Reaktion mit EDTA, was zur Komplexierung des zur Calpainaktivierung benötigten Calciums führt. Die Ansätze wurden nach Beenden der Reaktion fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Die Pipettierung der Ansätze erfolgte in folgender Reihenfolge:

1. 100 μl Messpuffer II
2. 100 μl $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$)
3. Messpuffer I
4. Proteasom-Inhibitor bzw. Calpain-Inhibitor
5. 4,68 μl Calpain I (=6 μg Calpain)

60 Minuten Inkubation bei 12°C

6. 100 μl SLLVY-AMC ($40 \times 10^{-5} \text{ M}$) in DMSO und KH-Puffer

60 Minuten Inkubation bei 12°C

7. 10 μl EDTA ($2 \times 10^{-1} \text{ M}$)

Die Ansätze wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 6.3.2.6-1 pipettiert.

V	Messpuffer I	clasto-Lactacystin b-Lactone	Calpain- Inhibitor	Calpain I (Aktivität =120U/mg Protein)
5-1	700 µl			
5-2	695 µl			4,68 µl
5-3	685 µl		10 µl Roche (10^{-2} M) (EK 10^{-4} M)	4,68 µl
5-4	685 µl		10 µl Roche (10^{-4} M) (EK 10^{-6} M)	4,68 µl
5-5	595 µl		100 µl Roche (10^{-6} M) (EK 10^{-7} M)	4,68 µl
5-6	685 µl		10 µl Roche (10^{-6} M) (EK 10^{-8} M)	4,68 µl
5-7	685 µl		10 µl CAL425 (10^{-2} M) (EK 10^{-4} M)	4,68 µl
5-8	685 µl		10 µl CAL425 (10^{-4} M) (EK 10^{-6} M)	4,68 µl
5-9	595 µl		100 µl CAL425 (10^{-6} M) (EK 10^{-7} M)	4,68 µl
5-10	685 µl		10 µl CAL425 (10^{-6} M) (EK 10^{-8} M)	4,68 µl
5-11	685 µl		10 µl CAL961 (10^{-2} M) (EK 10^{-4} M)	4,68 µl
5-12	685 µl		10 µl CAL961 (10^{-4} M) (EK 10^{-6} M)	4,68 µl
5-13	595 µl		100 µl CAL961 (10^{-6} M) (EK 10^{-7} M)	4,68 µl
5-14	685 µl		10 µl CAL961 (10^{-6} M) (EK 10^{-8} M)	4,68 µl
5-15	595 µl	100 µl (10^{-3} M) (EK 10^{-4} M)		4,68 µl
5-16	685 µl	10 µl (10^{-4} M) (EK 10^{-6} M)		4,68 µl
5-17	595 µl	100 µl (10^{-6} M) (EK 10^{-7} M)		4,68 µl
5-18	685 µl	10 µl (10^{-6} M) (EK 10^{-8} M)		4,68 µl

Tab. 6.3.2.6-1 Pipettierschema zu Versuchsgruppe V5; EK=Endkonzentration; Gesamtvolumen eines jeden Ansatzes einschliesslich aller Komponenten des Pipettierschemas ergibt 1000 µl

Diese Versuchsgruppe diene dem Nachweis der Spaltung von SLLVY-AMC durch Calpain I. Ausserdem sollte durch Testung unterschiedlicher Proteasom-Inhibitorkonzentrationen der Einfluss auf die SLLVY-Spaltung durch Calpain untersucht werden. Desweiteren sollte durch Testung verschiedener Calpain-Inhibitorkonzentrationen die optimale Hemmkonzentration der jeweiligen Calpain-Inhibitoren gefunden werden.

Als Kontrolle (Leerwert) für eine basale Spaltung des Substrates diene ein Testansatz ohne Calpain I und ohne Inhibitor (V5-1) und als Kontrolle für 100% Spaltung des Substrates diene ein Testansatz mit Calpain I und ohne Inhibitor (V5-2).

6.3.3 In vivo Versuche

Die in vivo Versuche wurden am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzen nach Langendorff durchgeführt. Die Herkunft der Kaninchen und deren Präparation, die isolierte Perfusion, sowie das Monitoring am Langendorff-Modell erfolgten gemäss Kapitel 3.1 bis 3.4.

Zur Calpain-Inhibition wurde in den in vivo Versuchen der Calpain-Inhibitor-I der Fa. Roche (s. 6.3.2.) verwendet. Der Calpain-Inhibitor CAL425 der Fa. BASF (s. 6.3.2) kam aufgrund unzureichend nachweisbarer Wirkung in den in vitro Versuchen unter Verwendung von Herzmuskelhomogenat nicht zur Anwendung. Auf die Verwendung des Proteasom-Inhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone musste aufgrund der sehr hohen Beschaffungskosten verzichtet werden.

Als Calpainsubstrat wurde SLLVY-AMC verwendet. Das Substrat wurde während der in vivo Versuche kontinuierlich und flowabhängig in einer Konzentration von 4×10^{-6} M mittels einer Rollenquetschpumpe BP742 (Fa. Fresenius Apparatebau, Bad Homburg) dem Perfusat beigemischt (s. 3.3). Die Substratzufuhr wurde dem koronaren Flow während der Versuche angepasst, so dass eine konstante Substratkonzentration im Perfusat sichergestellt werden konnte.

Die verwendeten Konzentrationen in den in vivo Versuchen sowohl von Substrat, als auch von Calpain-Inhibitor-I wurden nach den Ergebnissen der in vitro Versuchen festgelegt.

Zum Nachweis einer Calpainaktivierung und deren Quantifizierung in isoliert perfundierten Kaninchenherzen zu testen, wurden 6 Kaninchenherzen nach folgendem Schema untersucht:

G1	n=2	Keine Ischämie	
G2	n=2	30 min. Ischämie	
G3	n=2	30 min. Ischämie	Calpain-Inhibitor I Applikation

Als Kontrolllexperimente (G1) dienten 2 Kaninchenherzen, die konstant und ohne Inhibitor perfundiert wurden sowie 2 Kaninchenherzen (G2) mit Ischämie und ohne Inhibitor.

Der Versuchsablauf der Versuche G1-3 stellt sich wie folgt dar:

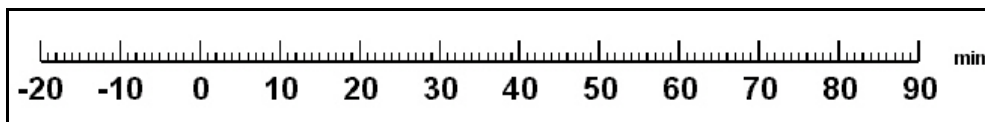


Abb. 6.3.3-1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes von G1

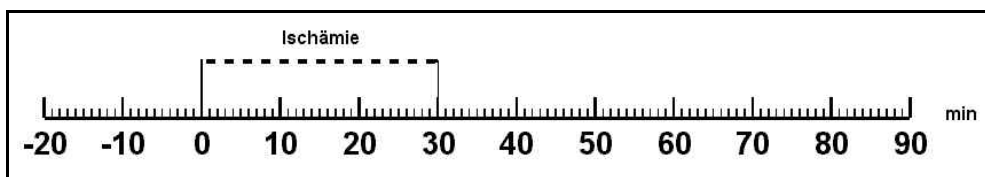


Abb. 6.3.3-2 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes von G2

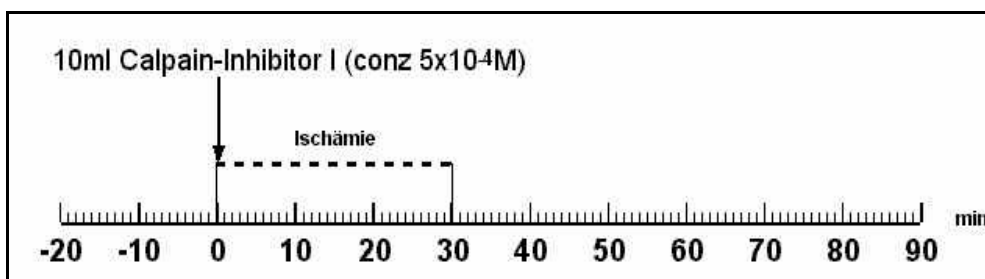


Abb. 6.3.3-3 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes von G3

Bei den Versuchen der Gruppen G2 und G3 erfolgte die Ischämiephase mit einer vollständigen Unterbrechung der Perfusatzufuhr im Sinne einer Globalischämie zur Minute 0 nach einer Vorlaufzeit von 20 Minuten. Diese Vorlaufzeit, auch „steady-state-period“ genannt, bezeichnet eine Phase, in der sich die Messparameter innerhalb vordefinierter Grenzen befinden. Dies setzte einen physiologischen pH-Wert von 7,4-7,45, sowie einen Sauerstoffpartialdruck von 500-600 mmHg und einen Kohlendioxidpartialdruck von 12-16 mmHg voraus.

Mit Beginn der Ischämie wurde das Substrat und der Calpain-Inhibitor-I (gelöst in Krebs-Henseleit-HAES) als Bolus von 10 ml über den aortokoronaren Katheter injiziert. Die Boluslösung verblieb während der Ischämiezeit aufgrund der unterbrochenen Perfusion in den Koronargefäßen.

Zusammensetzung der 10 ml Boluslösung:

- 7,75 ml Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung
- 0,25 ml SLLVY-AMC ($0,16 \times 10^{-3} \text{M}$, Endkonzentration $4 \times 10^{-6} \text{M}$)
- 2 ml Capain-Inhibitor I ($0,25 \times 10^{-2} \text{M}$, Endkonzentration $5 \times 10^{-4} \text{M}$)

Während der Versuche wurden bei allen 3 Versuchsgruppen Proben aus dem postkardialen (venösen) System zur Bestimmung des Substratspaltproduktes AMC (s. 6.2.2.) gesammelt. Die Sammelperioden dauerten jeweils 5 Minuten und wurden in Abständen von jeweils 15 Minuten wiederholt. Die erhaltene, flowabhängige Menge der Sammelprobe wurde für die anschließende Berechnung der absolut ausgeschiedenen Spaltproduktmenge gemessen. Aus den Perfusatsammelproben wurden jeweils 1ml entnommen, in Eppendorf-Hütchen abpipettiert und direkt nach dem Versuch im Institut für Organische Chemie fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Die gemessene Fluoreszenz in RFI eines Eppendorf-Hütchens wurde mit Hilfe der Eichkurve in absolute Menge AMC in pMol umgewandelt. Diese Konzentration von AMC wurde anschließend proportional zur jeweilig gesammelten Perfusatmenge einer Sammelprobe umgewandelt in pMol AMC/min.

6.4 Statistische Methoden

Eine statistische Auswertung der Versuchsreihen ist aufgrund der zu kleinen Versuchsgruppen nicht möglich. Es erfolgte daher eine deskriptive Auswertung der Ergebnisse. Die Ergebnisse von Versuchen mit mehreren Versuchsansätzen wurden als Mittelwerte angegeben. Die graphische Aufarbeitung der Ergebnisse erfolgte mit dem PC-Programm Stanford Graphics Version 3.0.

7 Zwischenergebnis

7.1 Auswertung der Ergebnisse der in vitro Versuche

In den in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Substrate SLLVY-AMC und SLV-AMC durch die in der Herzmuskulatur vorkommenden Enzyme, sowie durch Calpain I aus isolierten Schweineerythrocyten, gespalten werden. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition dieser Spaltung durch verschiedene Enzyminhibitoren möglich ist.

7.1.1 Wirkung verschiedener Proteaseninhibitoren auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskelhomogenat

In dieser Versuchsgruppe (V1) konnte eine Hemmung der Substratspaltung durch den Calpain-Inhibitor-I nachgewiesen werden. Bei einer Endkonzentration des Inhibitors von 10^{-4} M konnte eine Hemmung von 88%, bei einer Endkonzentration von 10^{-5} M konnte eine Hemmung von 66% erzielt werden.

Der Calpain-Inhibitor CAL425 konnte in den drei verwendeten Konzentrationen (V1-5 bis V1-7) die Substratspaltung durch Herzmuskelhomogenat nicht hemmen. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass im Versuch mit Herzmuskelhomogenat noch andere Enzyme an der Substratspaltung beteiligt sein müssen.

Die anderen getesteten Proteaseninhibitoren bzw. Proteinaseinhibitorcocktails (V1-8 bis V1-11) konnten ebenfalls keine wesentliche Inhibition (maximal 23%) erreichen.

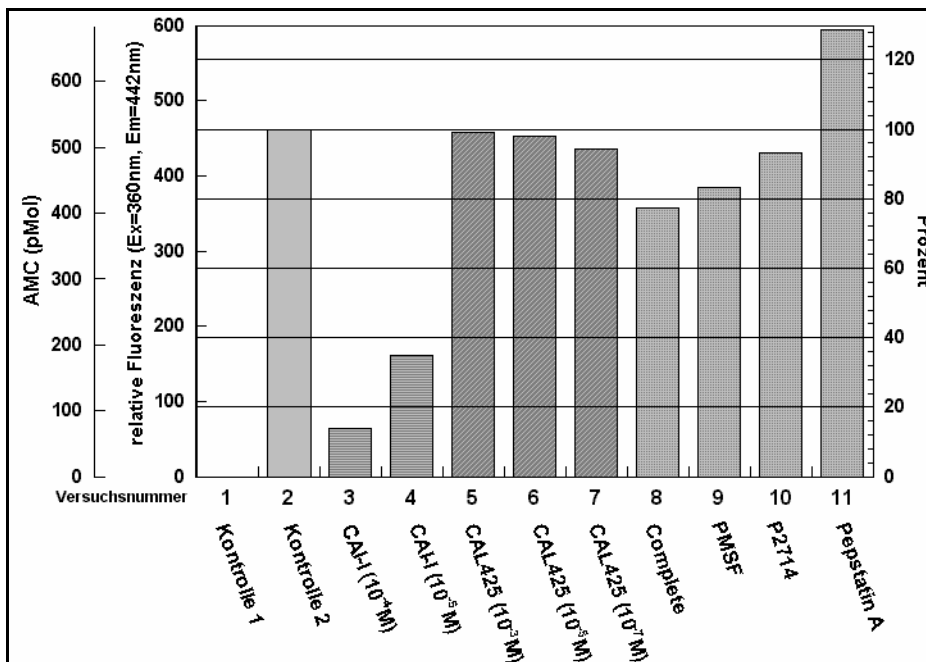


Abb. 7.1.1-1 Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskelhomogenat und deren Inhibition durch Proteaseninhibitoren, Darstellung als Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchsansätzen, Kontrolle 1 = ohne Substrat, Kontrolle 2 = mit Substrat.

7.1.2 Wirkung verschiedener Proteaseninhibitoren auf die Spaltung von SLY-AMC durch Herzmuskelhomogenat

Diese Versuchsgruppe (V2) zeigte eine geringere Spaltung des Substrates SLY-AMC im Vergleich zur Spaltung von SLLVY-AMC in Versuchsgruppe V1.

Jedoch zeigte sich auch hier eine 100%-ige Inhibition der Spaltung von SLY-AMC durch den Calpain-Inhibitor-I, insbesondere in den Endkonzentrationen 10^{-4} M und 10^{-6} M (V2-3 und V2-4). In dem Ansatz V2-5 mit einer Calpain-Inhibitor-I Endkonzentration von 10^{-8} M konnte keine Inhibition mehr erzielt werden.

Der Calpain-Inhibitor CAL425 konnte in den drei verwendeten Konzentrationen (V2-6 bis V2-8), wie auch in V1, die Substratspaltung durch Herzmuskelhomogenat nicht hemmen. Im Vergleich zu V1 kann man auch hier annehmen, dass im Versuch mit Herzhomogenat andere Enzyme an der Substratspaltung beteiligt sein müssen.

Analog zu V1 konnten die verschiedenen Proteaseninhibitoren (V2-9 bis V2-12) keine ausreichende Inhibition erreichen.

Die überschüssige Substratspaltung in V2-12 konnte nicht geklärt werden.

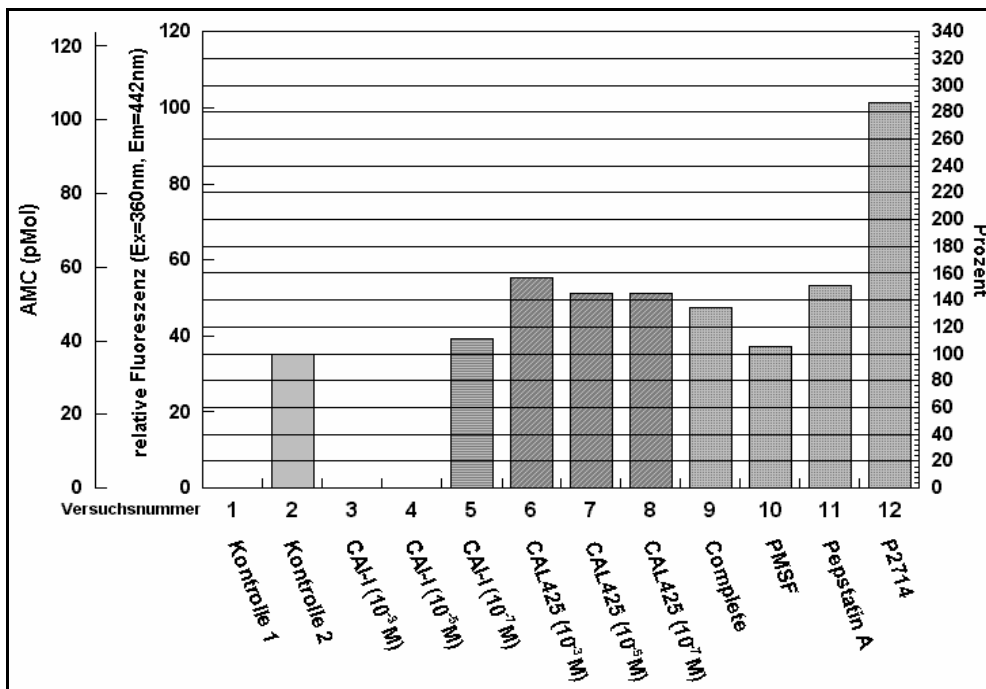


Abb. 7.1.2-1 Spaltung von SLY-AMC durch Herzmuskelhomogenat und deren Inhibition durch Proteaseninhibitoren, Darstellung als Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchsansätzen, Kontrolle 1 = ohne Substrat, Kontrolle 2 = mit Substrat.

7.1.3 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin b-Lactone auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskel- und Lungenhomogenat

In der Annahme, dass noch weitere Proteasen im Herzhomogenat an der Substratspaltung beteiligt sein müssen, wurde in dieser Versuchsgruppe (V3) ein Proteasominhibitor verwendet.

Desweiteren sollte getestet werden, ob die Quantifizierung der Spaltung des calpainspezifischen Substrates SLLVY-AMC auch auf eine Testung mit Lungenhomogenat (V3-7 bis V3-10) zu übertragen ist.

Als Ergebnis konnte eine gute Spaltung sowohl durch Herzmuskelhomogenat ohne Inhibition (V3-2), als auch durch Lungenhomogenat ohne Inhibition (V3-7) erzielt werden.

Ausserdem zeigen die Versuchsansätze mit Proteasominhibitor, sowohl in den Ansätzen mit Herzhomogenat, als auch in den Ansätzen mit Lungenhomogenat, eine konzentrationsabhängige Inhibition der Substratspaltung. Die halb-maximale Inhibition der Substratspaltung durch den Proteasominhibitor unter Verwendung von Herzmuskelhomogenat konnte in einer Konzentration von $1,25^{-6}$ M erreicht werden.

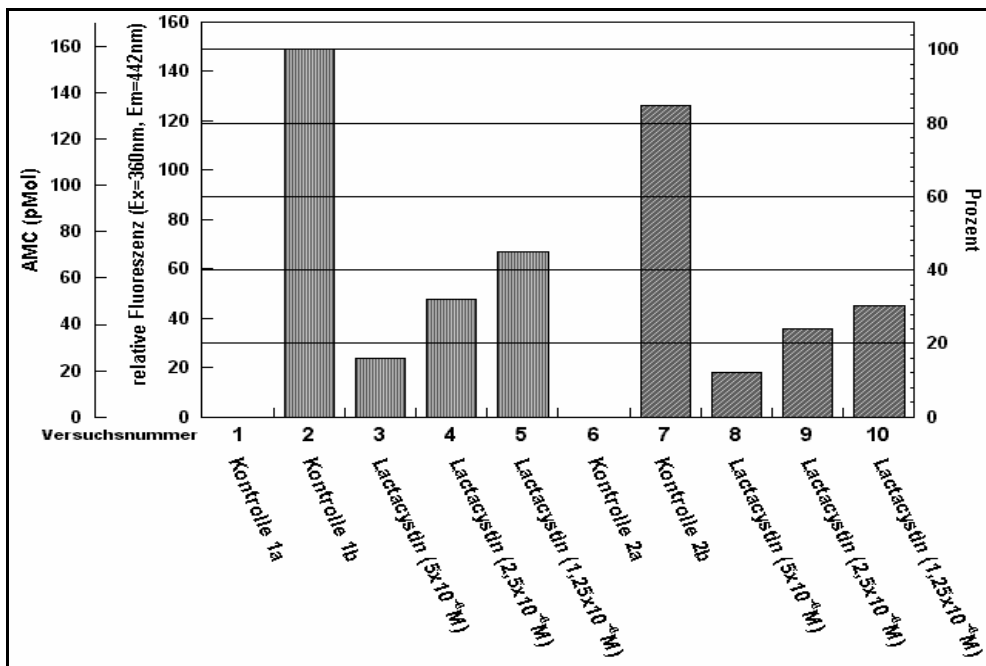


Abb. 7.1.3-1 Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskel- und Lungenhomogenat und Anwendung eines Proteasominhibitors, Darstellung als Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchsansätzen, Kontrolle 1a = ohne Substrat, Kontrolle 1b = mit Substrat, Lactacystin = clasto-Lactacystin β -Lactone.

7.1.4 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskelhomogenat

In dieser Versuchsgruppe (V4) konnte im Kontrollansatz ohne Inhibition (V4-2) eine gute Spaltung des Substrates erzielt werden. Eine Verdoppelung des Substratangebotes in V4-3 von $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ (Endkonzentration) auf $8 \times 10^{-6} \text{ M}$ (Endkonzentration) erbrachte keine wesentliche Steigerung der Spaltproduktkonzentration, so dass man von einem ausreichenden Angebot von Substrat in der Konzentration $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ ausgehen kann.

Die Verwendung des Proteasominhibitors (V4-3 bis V4-6) zeigte eine 95%-ige Hemmung der Substratspaltung bei einer Proteasominhibitorendkonzentration von $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ und eine halbmaximale Inhibition bei Proteasominhibitorendkonzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ und $0,5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Die restlichen Versuche (V4-7 bis V4-15), die in Kombination des Proteasominhibitors mit jeweils anderen Calpaininhibitoren in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt wurden, zeigten alle eine starke Hemmung der Substratspaltung. Der Grund liegt dabei in der zu hoch gewählten Proteasominhibitorkonzentration von $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, da der Ansatz mit $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Proteasominhibitor und ohne Calpaininhibitor (V4-4) eine ebenfalls

sehr starke Substratspaltungsinhibition ergibt. Eine kombinierte Inhibition konnte daher nicht nachgewiesen werden. Eine Wiederholung dieser Versuchsreihe mit einer angepassten Proteasominhibitorkonzentration konnte aufgrund der zu hohen Beschaffungskosten des Proteasominhibitors nicht durchgeführt werden.

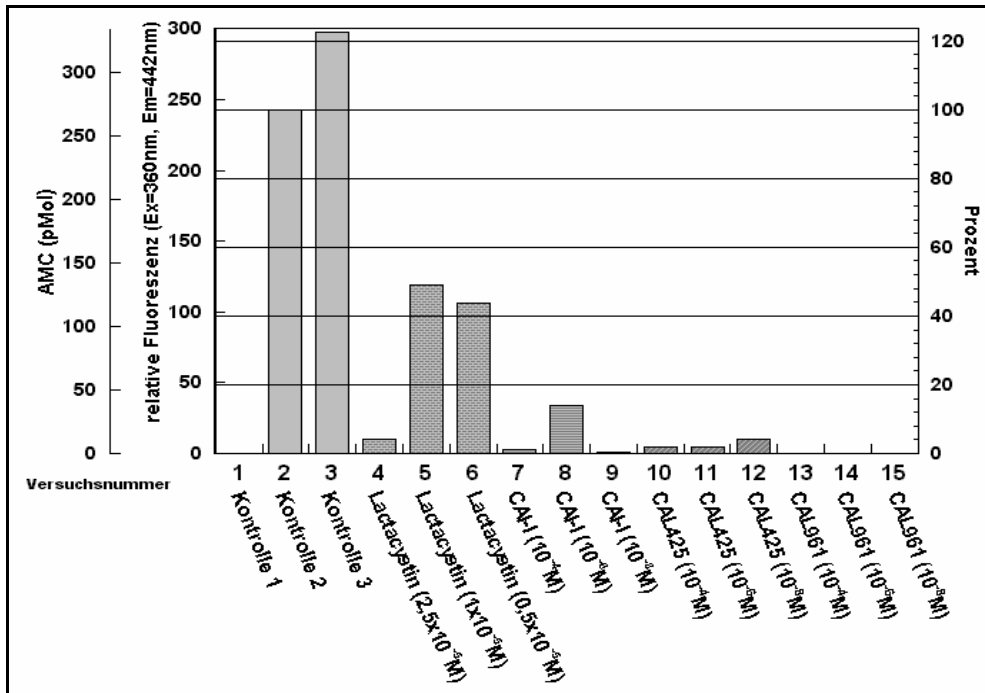


Abb. 7.1.4-1 Spaltung von SLLVY-AMC durch Herzmuskelhomogenat und Hemmung durch Calpain- und Proteasominhibitoren, Darstellung als Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchsansätzen, Kontrolle 1 = ohne Substrat, Kontrolle 2 = mit Substrat, Kontrolle 3 = mit Substrat, Lactacystin = clasto-Lactacystin β -Lactone.

7.1.5 Wirkung des Proteasominhibitors clasto-Lactacystin β -Lactone mit verschiedenen Calpaininhibitoren auf die Spaltung von SLLVY-AMC durch Calpain I

In dieser Versuchsgruppe (V5) konnte gezeigt werden, dass das calpain-spezifische Substrat SLLVY-AMC durch Calpain I aus isolierten Schweineerythrocyten gespalten wird.

Diese Spaltung konnte durch die drei verschiedenen Calpaininhibitoren sehr gut inhibiert werden. In den Endkonzentrationen 10^{-4} M und 10^{-6} M konnte jeweils durch den Calpain-Inhibitor-I (V5-3 und V5-4), CAL425 (V5-7 und V5-8) und durch CAL961 (V5-11 und V5-12) eine vollständige Inhibition der Substratspaltung durch Calpain I erreicht werden. In den Endkonzentrationen 10^{-7} M und 10^{-8} M wurde die Substratspaltung durch den Calpain-Inhibitor-I (V5-5 und

V5-6) zu 65% bzw. zu 48%, durch CAL425 (V5-9 und V5-10) zu 26% bzw. zu 11% und durch CAL961 (V5-13 und V5-14) zu 44% bzw. 9% gehemmt.

Der Proteasominhibitor Clasto-Lactacystin β -Lactone (V5-15 bis V5-18) hatte in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Substratspaltung von SLLVY-AMC durch Calpain I.

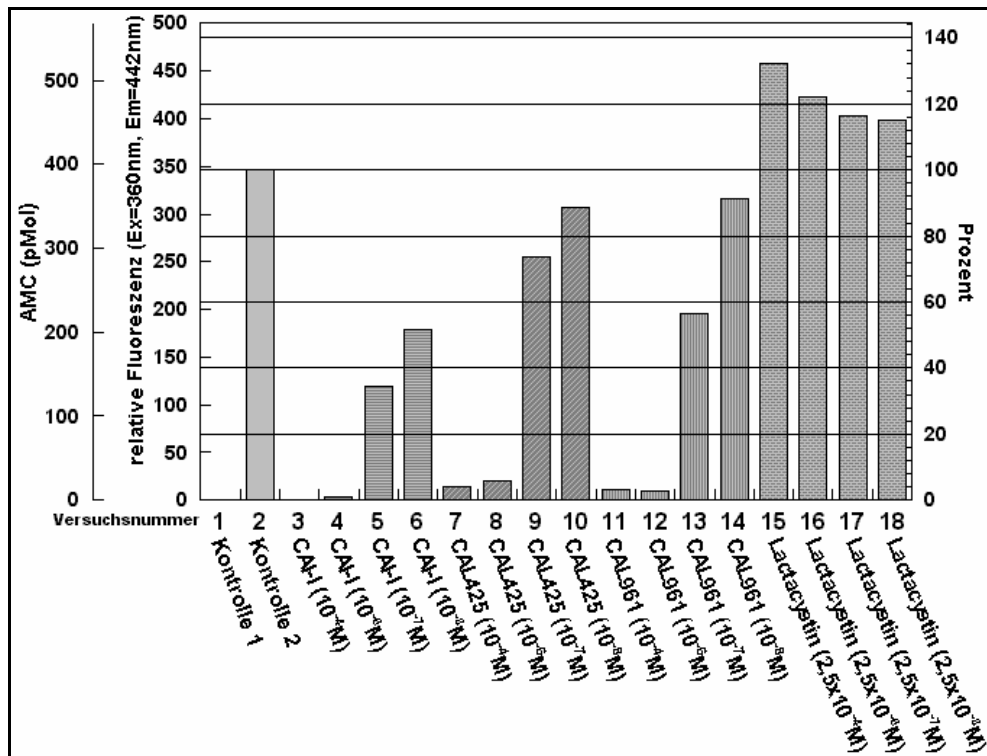


Abb. 7.1.5-1 Spaltung von SLLVY-AMC durch Calpain und Hemmung durch Calpain- und Proteasominhibitoren, Darstellung als Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchsansätzen, CAI-I = Calpain-Inhibitor I, Kontrolle 1 = ohne Substrat, Kontrolle 2 = mit Substrat, Lactacystin = clasto-Lactacystin β -Lactone.

7.2 Auswertung der Ergebnisse der in vivo Versuchsreihe

In der in vivo Versuchsreihe konnte eine kontinuierliche Spaltung des Substrates SLLVY-AMC nachgewiesen werden. Dies zeigte sich besonders in der Gruppe G1. In dieser nicht durch Ischämie manipulierten Versuchsgruppe konnte eine Basisspaltung von Substrat beobachtet werden.

In Versuchsgruppe G2 konnte nach der 30 minütigen Ischämiephase ein deutlicher Anstieg des Spaltproduktes AMC beobachtet werden. Die Spaltproduktkonzentration fiel in den folgenden Messungen in der kompletten Reperusionsphase auf das Niveau der Basisspaltung zurück.

Die Applikation von Calpain-Inhibitor-I als Bolus zeigte in G3 zu Beginn der Reperfusion eine nur gering gesteigerte Spaltproduktkonzentration im Vergleich

mit G1 und G2. In der Folge der Reperfusionsphase konnte ein leichter Anstieg der Spaltproduktkonzentration beobachtet werden.

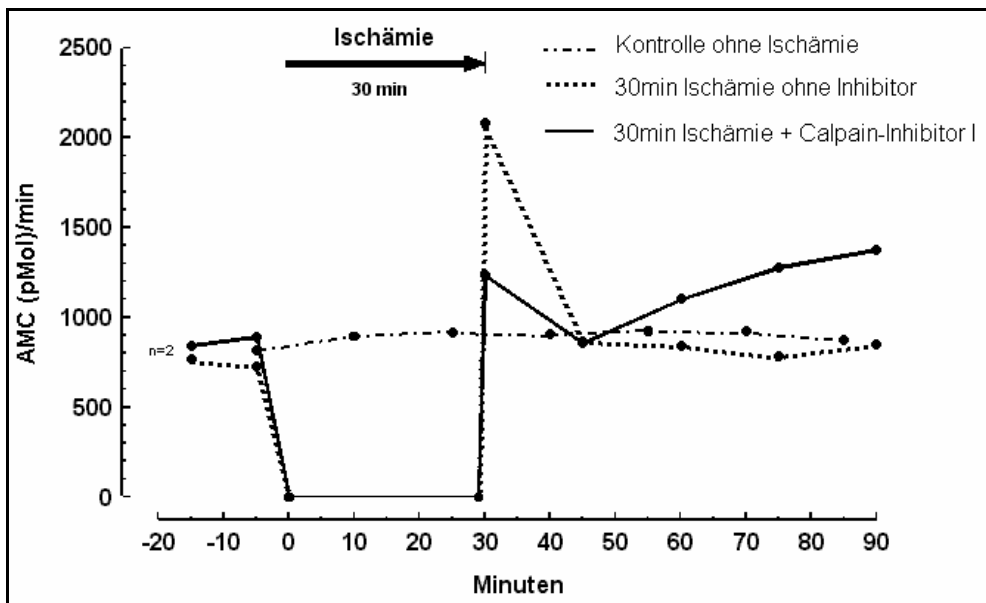


Abb. 7.2-1 Darstellung der Ergebnisse der in vivo Versuchsreihe, Darstellung als Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchsansätzen.

8 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Calpain auf die Reperusionsphase nach koronarer Ischämie am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens untersucht. Ausserdem wurde eine Methode zur Quantifizierung der Calpainaktivität am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzen mittels eines zellgängigen, calpainspezifischen Substrates entwickelt.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Applikation von LPS eine signifikante Besserung der untersuchten funktionellen Leistungsparameter durch Verwendung des Calpain-Inhibitors CAL425 erreicht werden konnte (s. 4.1). Es wurde in der mit CAL425 behandelten Gruppe ein signifikant niedrigerer koronarer Gesamtwiderstand ($5,24 \pm 0,77 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ($7,36 \pm 0,79 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) gegen Ende der Reperusionsphase beobachtet. Ausserdem zeigte sich ebenfalls am Ende der Reperusionsphase in der Inhibitorgruppe eine signifikant bessere linksventrikuläre Kontraktionsamplitude ($19 \pm 5,9 \text{ mmHg}$) im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe ($9,7 \pm 2,2 \text{ mmHg}$).

Daher kann geschlussfolgert werden, dass der hochspezifische und hochpotente Calpain-Inhibitor CAL425 einen protektiven Effekt auf das Myokard im Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens nach Gabe von LPS im Rahmen eines septischen Schocks hat. Zu diesem Ergebnis kommen auch Ruetten et al., die eine Verbesserung der Herz-Kreislauf-Funktion sowie der Organfunktion bei multiorganischer Schädigung am Ganztiermodell der Ratte mit Endotoxinschock durch Verwendung des Calpain-Inhibitor I beobachteten⁶⁰. In der Studie von Iwamoto et al. wurde ebenfalls durch Verwendung des Calpain-Inhibitor I ein um 50% vermindertes Infarktareal am Rattenherzen in einem Ganztiermodell nachgewiesen⁵³. Auch Saito et al. zeigten kardioprotektive Effekte des Calpain-Inhibitor I am Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens nach 12 stündiger hypothermischer Konservierung. Es wurde im Vergleich zu den unbehandelten Herzen eine bessere Herzfunktion sowie eine geringere Freisetzung der herzspezifischen Metabolite Kreatinphosphokinase, Lactat-Dehydrogenase und GOT nachgewiesen⁵⁴. Dieser Einfluss auf die Freisetzung der herzspezifischen Metabolite CK und LDH konnte in den in der

vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen statistisch nicht verifiziert werden.

Desweiteren konnte im zweiten Teil dieser Arbeit die inhibitorische Potenz von CAL425 für Calpain I ermittelt werden (s. 7.1.5). Die Spaltung des „calpain-spezifischen“ Substrates SLLVY-AMC durch aktiviertes Calpain I in vitro konnte durch CAL425 in einer Endkonzentration von 10^{-6} M vollständig inhibiert werden, während dieser Effekt im in vitro Versuch mit Herzmuskelhomogenat unter CAL425 Gabe in einer Endkonzentration von 5×10^{-5} M und durch Zugabe von SLLVY-AMC nicht beobachtet werden konnte. Dies führt zu dem Schluss, dass weitere Enzymsysteme an der Spaltung von SLLVY-AMC im Herzmuskelhomogenat beteiligt sein müssen, da die inhibitorische Potenz von CAL425 in unseren Versuchsansätzen mit Calpain I als alleinigen Enzym zweifelsfrei belegt wurde.

Der ebenfalls im zweiten Teil der Arbeit untersuchte Calpain-Inhibitor-I (N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal) zeigt jedoch sowohl im in vitro Versuch mit Calpain I (s. 7.1.5), als auch im in vitro Versuch mit Herzmuskelhomogenat (s. 7.1.1) eine gute Inhibition der Substratspaltung von SLLVY-AMC. Dies führt zu der Annahme, dass der Calpain-Inhibitor-I sowohl Calpain I als auch andere an der Spaltung des Substrates SLLVY-AMC beteiligte Enzymsysteme hemmt. Durch Verwendung verschiedener Proteaseninhibitoren und Proteaseninhibitorcocktails zur Inhibierung der klassischen Cystein-, Serin, Metallo- oder Aspartatproteasen konnte gezeigt werden, dass diese Enzymsysteme nicht an der Substratspaltung beteiligt sind. Weitere Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass das in zahlreichen in vitro und in vivo Studien zum Nachweis und Quantifizierung von Calpainaktivität verwendete als calpainspezifisch geltende Substrat SLLVY-AMC durch ein ubiquitäres, intrazelluläres, nicht lysosomales Multikomplexenzym, das Proteasom, gespalten wird. So konnte durch Verwendung des hochspezifischen Proteasominhibitors Clasto-Lactacystin β -Lactone die nahezu vollständige Inhibierung der Spaltung des Substrates SLLVY-AMC in einer in vitro Versuchsreihe mit Herzmuskelhomogenat (s. 7.1.3 und 7.1.4) nachgewiesen werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der verwendete Proteasominhibitor Clasto-Lactacystin β -Lactone keinen inhibitorischen Einfluss auf aktiviertes Calpain I hat (s. 7.1.5).

Dadurch konnte belegt werden, dass Clasto-Lactacystin β -Lactone die Substratspaltung des „calpainspezifischen“ Substrates SLLVY-AMC nicht durch Inhibierung von Calpain I, sondern durch die Inhibierung des Proteasoms hemmt, das somit wesentlich an der Spaltung von SLLVY-AMC beteiligt ist. Diese Beobachtung wird in der Veröffentlichung neuester Studienergebnisse von Karlsson et al. bestätigt⁶¹. An isolierten Schweinethyreozyten konnte Karlsson die Spaltung von SLLVY-AMC durch das Proteasom und dessen Inhibierung durch Lactacytin, nachweisen. Auch Chiba et al. konnten 1997 die Spaltung eines fluorogenen Substrates (Succinyl-Phe-Leu-Arg-Coumarylamido-4-Methanschwefelsäure) durch das Proteasom und dessen Inhibition durch einen Proteasominhibitor im Cytosol von isolierten Seesternoozyten zeigen⁶². Auch der von Chiba et al. verwendete Calpaininhibitor E64 konnte, ähnlich wie der in unseren Versuchen verwendete Calpaininhibitor CAL425, die intrazelluläre Spaltung des fluorogenen Substrates nicht inhibieren. Dies führt zu der Annahme, dass das häufig in in vivo Versuchen verwendete fluorogene Substrat SLLVY-AMC aufgrund der ausgeprägten Spaltung durch das Proteasom schlecht geeignet ist für den Nachweis einer Calpainaktivität in vivo. Somit bleibt die Verwendung weiterer fluorogener Substrate, wie zum Beispiel das von Chiba et al. verwendete Succinyl-Phe-Leu-Arg-Coumarylamido-4-Methanschwefelsäure, in in vivo Versuchen zur Aktivitätsmessung von Calpain fragwürdig, da auch hier mit der gleichzeitigen Spaltung durch die cytosolischen Proteasensysteme Calpain und Proteasom zu rechnen ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen, stellt sich ausserdem die Frage nach der inhibitorischen Spezifität des in zahlreichen in vitro und in vivo Studien verwendeten Calpain-Inhibitors-I (N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal). In unseren Untersuchungen konnte die inhibitorische Potenz des Calpain-Inhibitors-I bezüglich der Spaltung von SLLVY-AMC in vitro durch Calpain I bestätigt werden (s. 7.1.5). Im in vitro Versuch mit Herzmuskelhomogenat zeigte der Calpain-Inhibitor-I, anders als der ebenfalls sehr potente Calpain-Inhibitor CAL425, ebenfalls eine gute Hemmung der Substratspaltung (s. 7.1.1 und 7.1.2). Bezugnehmend auf das bisher erhaltene Ergebnis der Spaltung von SLLVY-AMC durch das Proteasom muss angenommen werden, dass der Calpain-Inhibitor-I nicht nur an der Hemmung der Substratspaltung durch

Calpain I, sondern auch an der Inhibition der Substratspaltung durch das Proteasom beteiligt sein muss. Diese Interaktion des Calpain-Inhibitor-I und dem Multikomplexenzym Proteasom, die bei dem von uns verwendeten Calpaininhibitor CAL425 nicht beobachtet werden konnte, zeigt, dass der Calpain-Inhibitor-I in hohem Masse auch an der Inhibition anderer intrazellulärer Enzymsysteme beteiligt ist und daher kein selektiver Calpaininhibitor ist. Daher ist seine Verwendung bei in vivo Studien zur selektiven Calpaininhibition fragwürdig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beobachteten protektiven Effekte bei Ischämie und inflammatorischen Reaktionen durch Calpaininhibition von grosser klinischer Relevanz sein könnten. Daher erscheint eine weitere Erforschung mit geeigneteren pharmakologischen Substanzen, wie etwa eines fluorogenen Designersubstrates für Calpain sinnvoll. Ausserdem erscheint eine genauere Differenzierung des Einflusses des Calpain-Inhibitor-I auf den Proteasommetabolismus wichtig. Besonders relevant erscheint die weitere Testung des Calpaininhibitors CAL425 zur Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschadens sowohl am Herzen, als auch an anderen Organsystemen aufgrund seiner hohen Spezifität und Potenz für Calpain.

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens nach Langendorff der Einfluss einer Calpainaktivierung auf die Reperfusionsphase nach koronarer Ischämie untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden mit dem Calpaininhibitor CAL425 behandelte Kaninchenherzen mit unbehandelten Herzen unter normothermer Globalischämie und Zugabe von Lipopolysacchariden zum Perfusat mit dem Ziel einer zusätzlich verstärkten Calpainaktivierung etwa im Rahmen einer Sepsis untersucht. Als Messparameter dienten hierbei die linksventrikuläre auxotonische Kontraktionsamplitude, der koronare Gefäßwiderstand und die Koronarperfusion, sowie die Freisetzung der Metaboliten Kreatinphosphokinase und Lactat-Dehydrogenase.

Es wurde nachgewiesen, dass nach Applikation von LPS durch Verwendung des Calpaininhibitors CAL425 eine signifikante Besserung der untersuchten funktionellen Leistungsparameter erreicht werden konnte (s. 4.1). Es wurde in der mit CAL425 behandelten Gruppe ein signifikant niedrigerer koronarer Gesamtwiderstand ($5,24 \pm 0,77 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ($7,36 \pm 0,79 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) gegen Ende der Reperfusionsphase beobachtet. Ausserdem zeigte sich ebenfalls am Ende der Reperfusionsphase in der Inhibitorgruppe eine signifikant bessere linksventrikuläre Kontraktionsamplitude ($19 \pm 5,9 \text{ mmHg}$) im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe ($9,7 \pm 2,2 \text{ mmHg}$).

Daher kann geschlossen werden, dass der hochspezifische und hochpotente Calpain-Inhibitor CAL425 einen protektiven Effekt auf das Myokard im Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzens bei Endotoxämie im Rahmen eines septischen Schocks hat.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Methode zur Quantifizierung der Calpainaktivität am Modell des isoliert perfundierten Kaninchenherzen mittels des zellgängigen, calpainspezifischen Substrates SLLVY-AMC (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amino-4-Methylcoumarin) entwickelt. Bei den mit dem Calpain-Inhibitor-I (N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal, Fa. Roche) behandelten Kaninchenherzen konnte direkt nach Durchführung einer normothermen Globalischämie eine verringerte Calpainaktivität, gemessen an der Ausscheidung des

Spaltproduktes AMC (Amino-4-Methylcoumarin), im Vergleich zur unbehandelten Gruppe beobachtet werden. Desweiteren konnte in in vitro Versuchen durch Differenzierung anderer, an der Spaltung des calpain-spezifischen Substrates beteiligter Proteasen der Einfluß des Multikomplex-enzym Proteasom näher untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Proteasom an der Spaltung von SLLVY-AMC massgeblich beteiligt ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Calpain-Inhibitor-I nicht nur an der Hemmung der Substratspaltung durch Calpain, sondern auch an der Inhibition der Substratspaltung durch das Proteasom beteiligt sein muss. Diese Interaktion des Calpain-Inhibitor-I und dem ubiquitären, intrazellulären, nicht lysosomalen Multikomplexenzym Proteasom zeigt, dass der Calpain-Inhibitor-I in hohem Masse auch an der Inhibition anderer intrazellulärer Enzymsysteme beteiligt ist und daher kein selektiver Calpaininhibitor ist. Daher ist seine Verwendung bei in vivo Studien zur selektiven Calpaininhibition fragwürdig. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beobachteten protektiven Effekte bei Ischämie und inflammatorischen Reaktionen durch Calpaininhibition von grosser klinischer Relevanz sein könnten. Daher erscheint eine weitere Erforschung mit geeigneteren pharmakologischen Substanzen, wie etwa eines fluorogenen Designersubstrates für Calpain sinnvoll. Ausserdem erscheint eine genauere Differenzierung des Einflusses des Calpain-Inhibitor-I auf den Proteasommetabolismus wichtig. Besonders relevant für die Klinik erscheint die weitere Testung des Calpaininhibitors CAL425 zur Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschadens sowohl am Herzen, als auch an anderen Organsystemen aufgrund seiner hohen Spezifität und Potenz für Calpain.

10 Literaturliste

1. Cavanagh SP, Gough MJ, Homer-Vanniasinkam S: The role of the neutrophil in ischaemia-reperfusion injury: potential therapeutic interventions. *Cardiovasc.Surg.* 1998;6:112-118
2. Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, Dhalla NS: Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am.J.Physiol.* 1999;277:H584-H594
3. Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VL: Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1999;31:1709-1715
4. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M: A fresh look at reperfusion injury (review). *Cardiovasc.Res.* 1998;38:291-300
5. Maxwell SRJ, Lip GYH: Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Cardiovasc.Res.* 1996;58:95-117
6. Huston RB, Krebs EG: Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca^{2+} . II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochemistry* 1968;7:2116-2122
7. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T: Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays* 1992;14:549-556
8. Suzuki K, Ohno S: Calcium Activated Neutral Protease - Structure-Function Relationship and Functional Implications. *Cell Structure and Fuction* 1990;15:1-6
9. Sorimachi H, Tsukahara T, Okada-Ban M, Sugita H, Ishiura S, Suzuki K: Identification of a third ubiquitous calpain species--chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim.Biophys.Acta* 1995;1261:381-393
10. Sorimachi H, Saido TC, Suzuki K: New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains. *FEBS Lett.* 1994;343:1-5
11. Herasse M, Ono Y, Fougerousse F, Kimura E, Stockholm D, Beley C, Montarras D, Pinset C, Sorimachi H, Suzuki K, Beckmann JS, Richard I: Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol.Cell Biol.* 1999;19:4047-4055
12. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K: Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 1994;8:814-822
13. Lee HJ, Sorimachi H, Jeong SY, Ishiura S, Suzuki K: Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol.Chem.* 1998;379:175-183
14. Lee HJ, Tomioka S, Kinbara K, Masumoto H, Jeong SY, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K: Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system. *Arch.Biochem.Biophys.* 1999;362:22-31
15. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K: Structure and physiological function of calpains. *Biochem.J.* 1997;328:721-732
16. Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S: Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 1995;376:523-529

17. Tidball JG, Spencer MJ: Calpains and muscular dystrophies. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*2000.Jan.;32.(1.):1.-5. 2000;32:1-5
18. Debiassi RL, Squier MK, Pike B, Wynes M, Dermody TS, Cohen JJ, Tyler KL: Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. *J.Virol.* 1999;73:695-701
19. Kawasaki H, Kawashima S: Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes (review). *Mol.Membr.Biol.* 1996;13:217-224
20. Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T: Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J.Biol.Chem.* 1984;259:12489-12494
21. Atsma DE, Bastiaanse EM, Jerzewski A, Van der Valk LJ, Van der Laarse A: Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition. *Circ.Res.* 1995;76:1071-1078
22. Nichols JC, Bronk SF, Mellgren RL, Gores GJ: Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1994;106:168-176
23. Rosser BG, Powers SP, Gores GJ: Calpain activity increases in hepatocytes following addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach. *J.Biol.Chem.* 1993;268:23593-23600
24. Schmaier AH, Bradford HN, Lundberg D, Farber A, Colman RW: Membrane expression of platelet calpain. *Blood* 1990;75:1273-1281
25. Kohli V, Gao W, Camargo CAJ, Clavien PA: Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:9354-9359
26. Ueda Y, Wang MC, Ou BR, Huang J, Elce J, Tanaka K, Ichihara A, Forsberg NE: Evidence for the participation of the proteasome and calpain in early phases of muscle cell differentiation. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 1998;30:679-694
27. Cottin P, Brustis JJ, Poussard S, Elamrani N, Broncard S, Ducastaing A: Ca(2+)-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim.Biophys.Acta* 1994;1223:170-178
28. Balcerzak D, Cottin P, Poussard S, Cucuron A, Brustis JJ, Ducastaing A: Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion. *Eur.J.Cell Biol.* 1998;75:247-253
29. Choi YH, Lee SJ, Nguyen P, Jang JS, Lee J, Wu ML, Takano E, Maki M, Henkart PA, Trepel JB: Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J.Biol.Chem.* 1997;272:28479-28484
30. Mellgren RL, Lu Q, Zhang W, Lakkis M, Shaw E, Mericle MT: Isolation of a Chinese hamster ovary cell clone possessing decreased mu-calpain content and a reduced proliferative growth rate. *J.Biol.Chem.* 1996;271:15568-15574
31. Zhang W, Lane RD, Mellgren RL: The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells. *J.Biol.Chem.* 1996;271:18825-18830
32. Grynspan F, Griffin WB, Mohan PS, Shea TB, Nixon RA: Calpains and calpastatin in SH-SY5Y neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation and neurite outgrowth: comparison with the human brain calpain system. *J.Neurosci.Res.* 1997;48:181-191

33. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Jackson SP: Calpain regulation of integrin alpha IIb beta 3 signaling in human platelets [In Process Citation]. *Platelets*.2000.Jun.;11.(4.):189-98. 11:189-198
34. Croce K, Flaumenhaft R, Rivers M, Furie B, Furie BC, Herman IM, Potter DA: Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J.Biol.Chem.* 1999;274:36321-36327
35. Solary E, Eymin B, Droin N, Haugg M: Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biol.Toxicol.* 1998;14:121-132
36. Squier MK, Cohen JJ: Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J.Immunol.* 1997;158:3690-3697
37. Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ: Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J.Cell Physiol.* 1999;178:311-319
38. Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KK: Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem.J.* 1996;319:683-690
39. Nath R, Raser KJ, McGinnis K, Nadimpalli R, Stafford D, Wang KK: Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport.* 1996;8:249-255
40. Debiase RL, Squier MK, Pike B, Wynes M, Dermody TS, Cohen JJ, Tyler KL: Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. *J.Virol.* 1999;73:695-701
41. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA: Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 1999;116:168-178
42. Edelstein CL, Wieder ED, Yaqoob MM, Gengaro PE, Burke TJ, Nemenoff RA, Schrier RW: The role of cysteine proteases in hypoxia-induced rat renal proximal tubular injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995;92:7662-7666
43. Yokota M, Tani E, Tsubuki S, Yamaura I, Nakagaki I, Hori S, Saido TC: Calpain inhibitor entrapped in liposome rescues ischemic neuronal damage. *Brain Res.* 1999;819:8-14
44. Hong SC, Goto Y, Lanzino G, Soleau S, Kassell NF, Lee KS: Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 1994;25:663-669
45. Hong SC, Lanzino G, Goto Y, Kang SK, Schottler F, Kassell NF, Lee KS: Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. *Brain Res.* 1994;661:43-50
46. Sorimachi Y, Harada K, Saido TC, Ono T, Kawashima S, Yoshida K: Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J.Biochem.(Tokyo.)* 1997;122:743-748
47. Grynspan F, Griffin WR, Cataldo A, Katayama S, Nixon RA: Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1997;763:145-158
48. Carafoli E, Molinari M: Calpain: a protease in search of a function? [published erratum appears in Biochem Biophys Res Commun 1998 Aug 19;249(2):572]. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998;247:193-203
49. Shields DC, Banik NL: Pathophysiological role of calpain in experimental demyelination. *J.Neurosci.Res.* 1999;55:533-541

50. Kadoya K, Azuma M, David LL, Shearer TR: Role of calpain in hydrogen peroxide induced cataract. *Curr.Eye Res.* 1993;12:341-346
51. Bradford HN, Schmaier AH, Colman RW: Kinetics of inhibition of platelet calpain II by human kininogens. *Biochem.J.* 1990;270:83-90
52. Crawford C: Inhibition of chicken calpain II by proteins of the cystatin superfamily and alpha 2-macroglobulin. *Biochem.J.* 1987;248:589-594
53. Iwamoto H, Miura T, Okamura T, Shirakawa K, Iwatate M, Kawamura S, Tatsuno H, Ikeda Y, Matsuzaki M: Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1999;33:580-586
54. Saito T, Mishima A, Asano M, Ukai T, Yamamoto S, Kunimatsu M, Sasaki M, Manabe T: Protective effects of calpain inhibitor for prolonged hypothermic cardiac preservation. *Jpn.J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1999;47:145-152
55. Guilbault GG: Practical Fluorescence: Theory, Methods and Techniques. *Dekker, New York* 1973;
56. Ichinose N, Schwedt G, Schnepel F, Adachi K: Fluorometric analysis in biomedical chemistry. *J.Wiley and Sons, New York* 1987;
57. Udenfried S: Fluorescence assay in biology and medicine. *Academic Press* 1964;
58. Dick LR, Cruikshank AA, Destree AT, Grenier L: Mechanistic Studies on the Inactivation of the Proteasome by Lactacystin in Cultured Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272:182-188
59. Fenteany G, Schreiber SL: Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J.Biol.Chem.* 1998;273:8545-8548
60. Ruetten H, Thiernemann C: Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* 1997;121:695-704
61. Karlsson JO, Lundquist J, Skoglund I, Nilsson M: Proteolytic activity in intact sheets of polarized epithelial cells as determined by a cell-permeable fluorogenic substrate. *Cell Biol.Int.*2000.;24.(4.):235.-43. 2000;24:235-243
62. Chiba K, Sato E, Hoshi M: Detection of in vivo proteasome activity in a starfish oocyte using membrane-impermeant substrate. *J.Biochem.(Tokyo.)* 1997;122:286-293

11 Anhang

11.1 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMC	7-Amino 4-Methyl Coumarin
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ATP	Adenosintriphosphat
bzw	Beziehungsweise
Conz	Konzentration
Em	Emissionswellenlänge [nm]
Ex	Excitationswellenlänge [nm]
Fa.	Firma
HH	Herzmuskelhomogenat
i.v.	intravenös
KH-Puffer	Krebs-Henseleit Puffer
min	Minuten
Mw	Molecular Weight (Molekulargewicht)
NO	Stickstoffmonoxid
RFI	Relative Fluoreszenzintensitäten
s.	Siehe
S.	Seite
s.c.	subcutan
SLLVY	Aminosäurenkette Suc-Leu-Leu-Val-Tyr

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Heinz Neuhof und seiner Frau Dr. med. Christiane Neuhof gilt mein besonderer Dank für die außergewöhnlich gute Betreuung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich sehr bei Herrn Harald Michnacs und Frau Antje Weber und für die Hilfe bei Präparation und allerlei Problemen im Laboralltag bedanken.

Bei Frau T. Wieth möchte ich mich ebenfalls herzlich für Ihre Unterstützung und außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Als Letztes danke ich Herrn Dr. Wolfgang Wende vom Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität für die tatkräftige Hilfe und zahlreichen Anregungen bei den fluoreszenzspektrometrischen Untersuchungen.

Lebenslauf - Markus Wolfgang Attenberger

Persönliche Angaben

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 09.04.1975
- Geburtsort: Bad Hersfeld
- Eltern: Wolfgang Attenberger und Erika Attenberger, geb. Schlachheit
- Geschwister: Christian Attenberger

Schul Ausbildung

1981-1991 Grundschule und Gymnasium Bad Hersfeld

1991-1994 Modellschule Obersberg Bad Hersfeld

1994 Abitur

Wehr-/Ersatzdienst

1994-1995 Zivildienst, Residenz Ambiente in Bad Hersfeld

Studium

1995 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen

1997 Ärztliche Vorprüfung

1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

4/2001 Praktisches Jahr: 1.Tertial: Anaesthesiologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen

8/2001 2.Tertial: Chirurgie, Thurgauisches Kantonsspital Frauenfeld, Schweiz

12/2001 3. Tertial: Innere Medizin, Med. Poliklinik III, Justus-Liebig-Universität, Giessen

2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 7/2002 AiP in der Abteilung für Anaesthesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Giessen

Giessen, 28.Juli 2003